

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Bioactividad tipo auxina y citoquinina de extractos de
macroalgas sobre cotiledones de
Cucumis Sativus L.**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica

AUTOR

Yulia Laura Vasquez

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

**A Dios, por ser mi guía
espiritual, y a mi madre por ser
mi ejemplo de vida.**

AGRADECIMIENTOS

Un profundo agradecimiento al Mg. César Córdova Castañeda encargado del Laboratorio de Ficología Marina de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por el tiempo dedicado, los conocimientos impartidos y las facilidades brindadas como infraestructura, equipos y materiales proporcionados para el desarrollo del presente estudio de investigación. Asimismo, hago extensivo mi agradecimiento al Laboratorio de Ecología Marina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por facilitarme el equipo requerido para los bioensayos.

Al Consejo Superior de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento de los proyectos: 121001051-“Domesticación del recurso *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh, una necesidad para una acuicultura rentable” (2012) y 131001181-“Bioactividad de extractos de macroalgas promisorias para la acuicultura” (2013). En el marco de estos dos proyectos fue desarrollado el presente estudio.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Las algas marinas	3
2.2. La agricultura orgánica en el Perú y el mundo	3
2.3. Extractos de macroalgas para su uso en la agricultura	4
2.4. Bioactividad de extractos comerciales de macroalgas sobre las plantas	5
2.5. Elaboración y bioactividad de extractos	6
2.6. Bioactividad tipo fitohormonas	7
2.6.1. Tipo auxina-enraizamiento	7
2.6.2. Tipo citoquinina-incremento de biomasa	8
2.6.3. Tipo citoquinina-síntesis de clorofila	8
2.7. Bioensayos utilizando cotiledones etiolados de <i>Cucumis sativus</i>	9
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	10
3.1. Objetivos	10
3.1.1. Objetivo general	10
3.1.2. Objetivos específicos	10
3.2. Hipótesis	10
4. MÉTODOS	11
4.1. Preparación de la muestra	11
4.1.1. Colecta	11
4.1.2. Procesamiento	12
4.1.3. Preparación del extracto acuoso de macroalgas	12
4.2. Preparación de los estándares	15
4.2.1. Bioactividad tipo auxina-enraizamiento	15
4.2.2. Bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa	15
4.2.3. Bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila	16
4.3. Metodología aplicada para los ensayos de bioactividad	16
4.3.1. Bioactividad tipo auxina-enraizamiento y citoquinina-incremento de biomasa	16
a) Preparación de material	16
b) Método del disco de papel	16
4.3.2. Bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila	17
4.4. Ensayos de bioactividad en cotiledones de <i>Cucumis sativus</i>	18
4.4.1. Material biológico	18
4.4.2. Calibración y ajustes de muestras	18
a) Germinación de semillas de <i>Cucumis sativus</i>	18
b) Determinación de la edad de los cotiledones para la instalación de los bioensayos	19
c) Determinación del número de días de evaluación	19
d) Estandarización de pesos	20
4.4.3. Instalación de material biológico	20
4.5. Análisis de las muestras	21
4.5.1. Análisis primario	21
4.5.2. Análisis estadístico	21
5. RESULTADOS	23
5.1. Estandarización de la metodología para el manejo de muestras en los bioensayos	23
5.1.1. Germinación de semillas de <i>Cucumis sativus</i>	23
5.1.2. Determinación de la edad de los cotiledones para la instalación de los bioensayos	23

5.1.3. Determinación del tiempo de tratamiento	25
5.1.4. Determinación del rango de peso inicial en cotiledones etiolados	25
5.2. Estandarización de hormonas	25
5.2.1. IAA (auxina-enraizamiento)	25
5.2.2. Kinetina (citoquinina-incremento de biomasa)	27
5.2.3. Kinetina (citoquinina-síntesis de clorofila)	28
5.3. Medición de la bioactividad de los extractos de macroalgas	31
5.3.1. Bioactividad tipo auxina-enraizamiento	31
a) Extracto de <i>Ulva nematoidea</i>	31
b) Extracto de <i>Macrocystis pyrifera</i>	32
c) Extracto de <i>Lessonia trabeculata</i>	34
d) Extracto de <i>Chondracanthus chamissoi</i>	35
5.3.2. Bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa	36
a) Extracto de <i>Ulva nematoidea</i>	36
b) Extracto de <i>Macrocystis pyrifera</i>	37
c) Extracto de <i>Lessonia trabeculata</i>	39
d) Extracto de <i>Chondracanthus chamissoi</i>	40
5.3.3. Bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila	41
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	47
8. RECOMENDACIONES	48
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
10. ANEXOS	54
10.1. Anexo 1: Marcas comerciales de extracto de macroalgas en el mundo	54
10.2. Anexo 2: Características de los materiales y equipos utilizados	55
10.3. Anexo 3: Gráficos comparativos de la bioactividad de extractos acuosos de macroalgas	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lugares de colecta de las macroalgas.	11
Tabla 2. Estandarización de IAA–enraizamiento. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos.....	26
Tabla 3. Estandarización de Kinetina–incremento de biomasa. Prueba Scheffé 0.05, grupos homogéneos. .	28
Tabla 4. Estandarización de Kinetina–síntesis de clorofila. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos.	29
Tabla 5. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extracto de <i>U. nematoidea</i>	32
Tabla 6. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable número de raíces adventicias, en cotiledones tratados con extractos de <i>U. nematoidea</i>	32
Tabla 7. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extracto de <i>M. pyrifera</i>	33
Tabla 8. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable número de raíces adventicias, en cotiledones tratados con extractos de <i>M. pyrifera</i>	33
Tabla 9. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extracto de <i>L. trabeculata</i>	34
Tabla 10. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extractos de <i>L. trabeculata</i>	35
Tabla 11. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de <i>U. nematoidea</i>	37
Tabla 12. Prueba Scheffé al 0.15, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extractos de <i>U. nematoidea</i>	37
Tabla 13. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de <i>M. pyrifera</i>	38
Tabla 14. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa, en cotiledones tratados con extractos de <i>M. pyrifera</i>	38
Tabla 15. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de <i>L. trabeculata</i>	39
Tabla 16. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa, en cotiledones tratados con extractos de <i>L. trabeculata</i>	40
Tabla 17. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de <i>C. chamissoi</i>	41
Tabla 18. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa, en cotiledones tratados con extractos de <i>C. chamissoi</i>	41
Tabla 19. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable síntesis de clorofila.	42
Tabla 20. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable síntesis de clorofila.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macroalgas, colecta y lugares de colección..	13
Figura 2. Preparación del extracto acuoso.	13
Figura 3. Diagrama de procedimientos realizados para los bioensayos con extractos acuosos de macroalgas	14
Figura 4. Obtención de cotiledones para bioensayos.....	22
Figura 5. Cualidades de <i>Cucumis sativus</i> para el bioensayo.	24
Figura 6. Estandarización de IAA. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias.....	26
Figura 7. Estandarización de Kinetina. Gráfico de medias para la variable incremento de la biomasa de los cotiledones tratados con Kinetina.	27
Figura 8. Estandarización de Kinetina. Gráfico de medias de la síntesis de clorofila, cuantificado en términos de absorbancia a 664 nm.	29
Figura 9. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>U. nematoidea</i>	31
Figura 10. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>M. pyrifera</i>	33
Figura 11. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>L. trabeculata</i>	34
Figura 12. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>C. chamissoi</i>	35
Figura 13. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>U. nematoidea</i>	36
Figura 14. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>M. pyrifera</i>	38
Figura 15. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>L. trabeculata</i>	39
Figura 16. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de <i>C. chamissoi</i>	40
Figura 17. Bioactividad tipo citoquinina–síntesis de clorofila. Gráfico de medias del valor de la absorbancia a 664 nm.	42

RESUMEN

La aplicación de extractos de algas verdes, pardas y rojas como acondicionador del suelo o fertilizante foliar ha mostrado amplia variedad de respuestas beneficiosas en el crecimiento y rendimiento de plantas cultivadas. En el mundo, se han realizado numerosos bioensayos para cuantificar la bioactividad de extractos, lo cual ha permitido la elaboración a nivel industrial de fertilizantes para la agricultura. En el presente estudio, se evaluó la bioactividad de extractos acuosos de *Ulva nematoidea*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cotiledones etiolados de *Cucumis sativus*. Los extractos se obtuvieron de 1 g de alga seca en 20 ml de agua destilada a 121 °C, 15 lbs y 30 min (Rama-Rao 1990). Para los ensayos se prepararon diluciones de 10, 5, 2.5 y 1.25%. Para la determinación de la bioactividad tipo auxina-enraizamiento y citoquinina-incremento de biomasa, se utilizó el método del disco de papel. La bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila fue determinada utilizando el método de Fletcher y Mccullagh (1971). Los resultados obtenidos muestran que el extracto de *M. pyrifera* (10%), tuvo un efecto óptimo de bioactividad tipo auxina-enraizamiento de 4.1 ± 0.4 raíces y de bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa de 22.7 ± 0.8 mg. Respecto de la bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila, no se observó un incremento significativo de la síntesis de clorofila. Del presente trabajo de investigación se concluye que los extractos acuosos de *Ulva nematoidea*, *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata* tienen bioactividad tipo auxina-enraizamiento y citoquinina-incremento de biomasa.

Palabras clave: Bioactividad tipo auxina, bioactividad tipo citoquinina, extractos de macroalgas, cotiledón, *Cucumis sativus*, agricultura orgánica.

ABSTRACT

The application of green, brown and red seaweed extracts as a soil conditioner or foliar fertilizer has showed wide variety of beneficial responses in growth and yield plants crop. Worldwide, there have been numerous bioassays to quantify the bioactivity of extracts which has allowed the development of industry-wide fertilizer for agriculture. In the present study, the bioactivity of the extracts *Ulva nematoidea*, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* and *Chondracanthus chamissoi* was evaluated on etiolated *Cucumis sativus* cotyledons. Extracts were obtained from 1 g of dry seaweed in 20 ml of distilled water at 121 ° C, 15 lbs and 30 min (Rama-Rao 1990). For assays, dilutions of 10, 5, 2.5 and 1.25% were prepared. To determine of auxin-like bioactivity (rooting) and cytokinin-like bioactivity (increased biomass), was used the paper disk method. Cytokinin-bioactivity (chlorophyll synthesis) was determined using the method by Fletcher y Mccullagh (1971). The results obtained show that the extract of *M. pyrifera* (10%) had an optimal effect of auxin-like bioactivity (rooting) 4.1 ± 0.4 roots, and also cytokinin-like bioactivity (biomass increase) 22.7 ± 0.8 mg. About cytokinin-like bioactivity (synthesis of chlorophyll), a significant increase of chlorophyll synthesis was not observed. In this research, it is concluded that the aqueous extracts of *Ulva nematoidea*, *Macrocystis pyrifera* and *Lessonia trabeculata* have auxin-like bioactivity (rooting) and cytokinin-like bioactivity (biomass increase).

Keywords: Auxin-like bioactivity, cytokinin-like bioactivity, seaweed extracts, cotyledon, *Cucumis sativus*, organic agriculture.

1. INTRODUCCIÓN

En el mundo actual se presenta una mayor conciencia ecológica, cuidado del medio ambiente y consumo de alimentos saludables, debido a un evidente cambio climático progresivo (Lotter 2003). Esto ha generado en el agro, principalmente en la agricultura orgánica, una necesidad de adquirir aditivos naturales que incrementen su rendimiento (Gireesh *et al.* 2011). En ese sentido, los extractos de macroalgas son una alternativa para incrementar la producción del agro en general y, en particular, de la agricultura orgánica, la cual requiere de certificación como producto orgánico. La evaluación de bioactividad permitirá el uso del recurso alga en el Perú, logrando en un futuro cercano una acuicultura sustentable económicamente.

Las primeras informaciones sobre la eficacia de bioactividad de los extractos de algas marinas derivan de ensayos realizados en campo utilizando el extracto de *Ascophyllum nodosum*, primero como un acondicionador para el suelo y más adelante como un fertilizante foliar (Craigie 2011). En la actualidad, existe numerosa información científica acerca del rol estimulante de los extractos de algas sobre el crecimiento, rendimiento, tolerancia al estrés biótico —como la infección por hongos—, y al estrés abiótico —como el estrés salino e hídrico—, los cuales han sido resumidos en revisiones recientes (Khan *et al.* 2009; Craigie 2011), y en la actualidad muchos de estos extractos se comercializan y elaboran principalmente a partir de algas pardas, rojas y verdes (Khan *et al.* 2009).

Existen varios métodos de preparación de extractos, sea por hidrólisis alcalina (Tay *et al.* 1987), cambio brusco de presiones para la liberación del contenido celular (Featonby-Smith y Van Staden 1983) o una extracción acuosa (Bhosle *et al.* 1975; Eswaran *et al.* 2005; Rama-Rao 1990). Rama-Rao (1990) elaboró un protocolo para la extracción acuosa de sustancias bioactivas de algas, el cual ha sido utilizado por numerosos investigadores con ligeras modificaciones (Kumar *et al.* 2012; Sasikumar *et al.* 2011;

Sridhar y Rengasamy 2010). La aplicación de estos extractos en pequeñas concentraciones ha logrado incrementar el crecimiento y rendimiento de las plantas (Kumar *et al.* 2012; Sasikumar *et al.* 2011; Sridhar y Rengasamy 2010).

Se han identificado y cuantificado fitohormonas (Duan *et al.* 1995; Featonby-Smith y Van Staden 1983, 1984; Li *et al.* 2007; Sanderson *et al.* 1987; Stirk *et al.* 2009; Tay *et al.* 1985, 1987; Zhang *et al.* 1991); sin embargo, los niveles de fitohormonas en los extractos son mínimos, de manera que no serían responsables de la potente bioactividad sobre la planta. Tampoco se ha podido atribuir los efectos directos o indirectos a moléculas en particular (monómeros o polímeros); pero, se sabe que actúan modulando las vías innatas del metabolismo de fitohormonas en plantas, promoviendo o reprimiendo la expresión de los genes involucrados, brindando un beneficio indiscutible en la agricultura (Wally *et al.* 2013). Rayorath *et al.* (2008) utilizó *Arabidopsis thaliana* como modelo para estudiar la bioactividad del extracto de *A. nodosum* y aplicó un bioensayo de elongación de raíces, crecimiento en medio líquido y crecimiento en invernadero; además, utilizó un reportero GUS y demostró que los extractos de macroalgas modulan la concentración y localización de auxinas, lo que podría explicar el mejor crecimiento de la planta.

Si bien es cierto estudios recientes han utilizado metodologías novedosas para la identificación de sustancias bioactivas, Craigie (2011) resalta la importancia de los bioensayos como una técnica utilizada desde hace más de 50 años, pero muy útil para la cuantificación del efecto de extracto de macroalgas a partir de mediciones de crecimiento simples usando plantas de crecimiento rápido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Las algas marinas

Las algas son un componente importante de los ecosistemas marinos costeros. La biodiversidad de algas, en el mundo, se estima en alrededor de 9800 especies distribuidas, de acuerdo con su pigmentación, en tres categorías taxonómicas: Phaeophyceae (1843), Rhodophyta (6429) y Ulvophyceae (1586) (Guiry y Guiry 2013a, 2013b). En el Perú, Acleto (1988) estima 228 especies: Phaeophyceae (31), Rhodophyta (160) y Ulvophyceae (37). Las Phaeophyceae (algas pardas) alcanzan sus niveles máximos de biomasa en las costas rocosas de las zonas templadas, y han sido utilizadas tradicionalmente en la agricultura como biofertilizadores (Khan *et al.* 2009).

2.2. La agricultura orgánica en el Perú y el mundo

La agricultura orgánica es el cultivo agrícola libre de pesticidas, herbicidas y fertilizantes inorgánicos (Bengtsson *et al.* 2005). A nivel mundial, se han mantenido altas tasas de crecimiento en las ventas de productos orgánicos certificados, en promedio de 20 a 25% cada año, desde 1990 (Lotter 2003). La agricultura orgánica se ha extendido a más de 130 países de todo el mundo y, solo en América Latina, 220.000 productores lograron 6,4 millones de hectáreas de cultivo orgánico en 2007; esto constituye el 20% de la tierra orgánica del mundo, siendo la mayoría de la producción orgánica de América Latina para la exportación (Willer y Klicher 2009). En nuestro país, este tipo de cultivo está incrementando la superficie de su producción cada año, por ejemplo: en 2006, se tenía un área total de 270.618 hectáreas y, en 2012, 305 mil hectáreas. Los productos con mayor producción son: café, cacao, banano, quinua y castaña. Pero, existen más de 100 productos certificados como orgánicos en áreas pequeñas y comercializadas en volúmenes menores (SENASA 2012). De acuerdo con Badgley (2007), la principal resistencia a la propuesta de que la agricultura orgánica pueda contribuir

significativamente a la oferta mundial de alimentos son sus bajos rendimientos y las cantidades insuficientes de abonos orgánicos disponibles, por lo que se debería asignar más recursos para la investigación de métodos agroecológicos de producción de alimentos, ya que la agricultura orgánica tiene el potencial de contribuir de forma sustancial a la oferta mundial de alimentos, al mismo tiempo que reduce el impacto ambiental negativo de la agricultura convencional.

2.3. Extractos de macroalgas para su uso en la agricultura

Los extractos de macroalgas son preparaciones acuosas que varían en color, desde casi incoloros hasta un marrón oscuro intenso; del mismo modo, varían también ampliamente en olores, viscosidades y contenido de compuestos. Se obtienen por procesos de extracción utilizando agua, álcalis o ácidos (Craigie 2011) y, en la actualidad, muchos de estos extractos de macroalgas se han convertido en productos comerciales disponibles en el mercado para la agricultura (Khan *et al.* 2009; Hong *et al.* 2007).

Los extractos comerciales se fabrican principalmente de algas pardas como *Ascophyllum nodosum*, *Durvillaea* spp., *Ecklonia maxima*, *Laminaria* spp. y *Sargassum* spp. (Craigie 2011); siendo también utilizadas las algas rojas: *Kappaphycus alvarezii* (Rathore *et al.* 2009) y algas verdes: *Ulva lactuca* (Nabti *et al.* 2010). Las primeras informaciones sobre la eficacia de bioactividad de extractos de macroalgas se derivan principalmente de observaciones de ensayos realizados en invernadero o campo, utilizando el extracto comercial “Maxicrop” (anexo 1), primero como un acondicionador para el suelo y, a partir de la década de 1960, como un fertilizante foliar (Craigie 2011).

Craigie (2011), en una extensa revisión sobre extractos de macroalgas, agrupa los conocimientos actuales en tres grandes períodos: i) Desde 1950 hasta principios de 1970, ii) 1970 a 1990 y iii) 1990 hasta la actualidad. La información obtenida en el período

inicial derivaba de bioensayos con análisis químicos, pero se vio obstaculizada, en gran medida, por la falta de tecnología adecuada. El segundo período mejoró notablemente en sus resultados con las técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); estas, junto con la espectrometría de masas (MS), se aplicaron en la identificación de componentes específicos presentes en las algas marinas y extractos comerciales. El período actual trajo continuas mejoras en los métodos de análisis de cromatografía, y se están usando para detectar y comparar los cambios en los metabolitos de los extractos de macroalgas y plantas tratadas con extractos. Asimismo, el autor resalta la importancia de los bioensayos, ya que se han mantenido esencialmente inalterados y son el único método para la detección de compuestos bioactivos y que permiten obtener información comparativa a partir de mediciones de crecimiento simple usando plantas de crecimiento rápido.

2.4. Bioactividad de extractos comerciales de macroalgas sobre las plantas

Las plantas tratadas con extractos de macroalgas muestran una amplia variedad de respuestas, y sus efectos beneficiosos mostraron ser dependientes de cómo y cuándo fueron aplicados (Crouch y Van Staden 1992). La aplicación sobre las raíces del extracto “Kelpak” (anexo 1) incrementó el crecimiento vegetativo en plántulas de *Brassica oleracea* var. *capitata* (Aldworth y Van Staden 1987), la longitud y el número de raíces, además de la calidad y capacidad de sobrevivir al trasplante en *Pinus pinea* (Aztmon y Van Staden 1994), el crecimiento vegetativo en *Lycopersicon esculentum* (Crouch y Van Staden 1992) y el crecimiento y rendimiento en *Tagetes patula* (Van Staden *et al.* 1994); mientras que su aplicación foliar mejoró el desarrollo de los frutos en *Lycopersicon esculentum* (Crouch y Van Staden 1992) y el rendimiento en *Tagetes patula* (Van Staden *et al.* 1994). Asimismo, la aplicación foliar de “Goemar GA 14” (anexo 1) sobre plántulas de *Zea mays* incrementó su biomasa, tanto de la raíz como del tallo, hasta un 25%

respecto del control (Jeannin *et al.* 1991), y el extracto “IPA” (anexo 1) incrementó el crecimiento y la resistencia al estrés hídrico de *Vitis vinifera* (Mancuso *et al.* 2006).

2.5. Elaboración y bioactividad de extractos

La diversidad de productos comerciales de macroalgas ha surgido no solo de la utilización de diferentes especies de alga, sino también de la variedad de métodos para su preparación (Jeannin *et al.* 1991). “SEASOL” (anexo 1) es elaborado a partir de una hidrólisis alcalina de *Durvillea potatorum* (Tay *et al.* 1987), “Kelpak” (anexo 1) se obtiene de un proceso donde se expone el alga fresca a un cambio rápido de presiones que producen una explosión celular, logrando liberar el contenido celular y obtener el concentrado líquido (Featonby-Smith y Van Staden 1983).

También se han descrito varios métodos de extracción acuosa: Bhosle *et al.* (1975) utilizó la proporción 1:1 (alga fresca, agua destilada), la cual fue esterilizada en la autoclave a 121°C, 30 lbs durante 1 h para la extracción y eliminación de sustancias contaminantes que pudieran fermentar el producto. Con base en éste método de extracción, se ensayó el extracto de *Rosenvingea intricata* en semillas de *Abelmoschus esculentus* (Thirumaran *et al.* 2009), y el extracto de *Sargassum myriocystum* en *Vigna mungo* (Kalaivanan y Venkatesalu 2012), y se observaron resultados significativos de crecimiento vegetativo, número de raíces, contenido de clorofila y biomasa de las plantas. Eswaran *et al.* (2005) patentó la preparación de un extracto acuoso donde no se utiliza una proporción, y las macroalgas frescas son homogeneizadas en un molino, luego filtradas y el sobrenadante (savia) es separado y concentrado (100%) para después aplicarlo mediante diluciones sobre cultivos agrícolas como pulverizador foliar. Rathore *et al.* (2009), aplicando este método y con el extracto del alga *Kappaphycus alvarezii* diluido al 15%, logró un incremento significativo en el crecimiento vegetativo y rendimiento en número de semillas por vaina de *Glycine max* “soya”. Rama-Rao (1990) elaboró un

protocolo de preparación de un extracto acuoso a partir de *Sargassum* spp., donde el alga fue secada, pulverizada y sometida a presión en la autoclave por 2 horas, con la proporción 1:10 (alga seca, agua); el extracto fue filtrado, centrifugado y el sobrenadante considerado el 100%. Se han realizado varias investigaciones aplicando este método con modificaciones en la proporción (1:20 w/v) y el tiempo de extracción (30 min. Kumar *et al.*, 2012; Sasikumar *et al.* 2011; Sridhar y Rengasamy 2010); por ejemplo, las diluciones 0,5 y 1,0% del extracto de *Sargassum wightii* aplicado sobre semillas de *Vigna radiata* han reducido el tiempo de germinación e incrementado el crecimiento vegetativo de las plantas (Kumar *et al.* 2012); y el extracto de *Ulva lactuca*, al 1%, aplicado foliarmente sobre plántulas de *Tagetes erecta* incrementaron el crecimiento vegetativo, así también el número y peso fresco de las flores (Sridhar y Rengasamy 2010). En consideración a estos antecedentes presentados, se observa que el método de extracción acuoso propuesto por Rama-Rao (1990) utiliza menos cantidad de alga en la elaboración del extracto y logra incrementar el crecimiento y rendimiento de las plantas aplicando, además, bajas diluciones del extracto (Kumar *et al.* 2012; Sasikumar *et al.* 2011; Sridhar y Rengasamy 2010).

2.6. Bioactividad tipo fitohormonas

2.6.1. Tipo auxina-enraizamiento

Respecto de la prueba de bioactividad tipo auxina-enraizamiento, se ha evaluado el efecto de los extractos concentrados de “Kelpak”, “Maxicrop”, “Redicrop”, “SEAMAC”, “SM3” (anexo 1) en plántulas de 10 días de edad de *Vigna mungo*; para ello, hipocotilos de 12 cm fueron colocados en viales con extractos de macroalgas durante 8 h y después, 8 días en viales con agua; observándose, al término del experimento, el desarrollo de raíces en la base y parte lateral del tallo (Stirk y Van Staden 1997). Aplicando la misma metodología de Stirk y Van Staden (1997), Kumari *et al.* (2011) utilizó el extracto acuoso

de *Sargassum johnstonii* sobre plántulas de *Vigna mungo* y Laura *et al.* (2012) trabajó con extractos alcalinos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata* y *Desmarestia munda* sobre plántulas de *Pisum sativus*. Ambos estudios determinaron que los extractos de macroalgas, tanto acuoso como alcalino, inducían el desarrollo de raíces adventicias corroborando lo encontrado por Stirk y Van Staden (1997).

Utilizando la fitohormona IAA (ácido indol-3-acético; concentraciones 0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 ppm), Zhao *et al.* (1992) ensayó bioactividad tipo auxina-enraizamiento sobre cotiledones etiolados de *Cucumis sativus* con el método del disco de papel, para ello la fitohormona se aplicó sobre el papel filtro y se le dejó distribuirse uniformemente, de esta manera evitó que precipitara. Los cotiledones fueron colocados sobre el disco de papel y luego de 5 días habían desarrollado raíces adventicias, la concentración óptima fue 30 ppm de IAA.

2.6.2. Tipo citoquinina-incremento de biomasa

Narain y Laloraya (1974) estudiaron la bioactividad de la citoquinina kinetina (10 ppm) sobre cotiledones de *Cucumis sativus*, estimulándose el incremento del peso fresco en un 100% respecto del control (agua). Aplicando el método mejorado del disco de papel, Zhao *et al.* (1992) ensayó bioactividad una estandarización con kinetina (0.3, 1, 3, 10, 30 y 100 ppm). Claramente, la fitohormona estimuló la expansión de los cotiledones etiolados de *Cucumis sativus*, siendo el peso fresco de los cotiledones linealmente proporcional a la concentración de kinetina, con un resultado óptimo a 100 ppm.

2.6.3. Tipo citoquinina-síntesis de clorofila

Fletcher y McCullagh (1971) determinaron que las citoquininas tienen un papel importante en la síntesis de clorofila, al ensayar su bioactividad sobre cotiledones

etiolados de *Cucumis sativus* de 6 días de edad, los cuales fueron tratados con fitohormonas (kinetina, zeatina o benciladenina, en las concentraciones 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10 ppm) en oscuridad y durante 14 h, luego expuestos a luz artificial por 4 h; logrando un incremento de hasta 450% del contenido de clorofila expresado como absorbancia a 665 nm en los extractos de acetona de cotiledones tratados con 10 ppm de kinetina, con respecto al control negativo. Kumari *et al.* (2011) aplicó esta metodología utilizando el estándar kinetina para comparar la bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila del extracto acuoso de *Sargassum johnstonii* (diluciones: 0.1, 0.4 y 0.8%) sobre cotiledones de *Cucumis sativus*, obteniendo un resultado óptimo en la dilución 0.8%.

2.7. Bioensayos utilizando cotiledones etiolados de *Cucumis sativus*

Se han realizado bioensayos sobre *Cucumis sativus* (Harvey *et al.* 1974; Fletcher y McCullagh 1971; Kumari *et al.* 2011; Narain y Laloraya 1974; Tanaka y Tsuji 1980; Zhao *et al.* 1992). Fletcher y McCullagh (1971) consideran el uso de esta especie como un material biológico sensible a bajas concentraciones de reguladores de crecimiento, como citoquininas, auxinas (Zhao *et al.* 1992) y extracto de macroalgas (Kumari *et al.* 2011), además de presentar un rápido desarrollo, en comparación con otros métodos que tardan más tiempo en llevarlas a cabo y no son sensibles a bajas concentraciones de fitohormonas (Letham 1967).

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo general

Evaluar la bioactividad tipo auxina y citoquinina de los extractos de macroalgas sobre cotiledones de *Cucumis sativus*.

3.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la bioactividad tipo auxina-enraizamiento.
- Evaluar la bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa.
- Evaluar la bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila.

3.2. Hipótesis

H_0 = Los extractos de macroalgas marinas no tienen bioactividad tipo fitohormonas.

H_1 = Los extractos de macroalgas marinas tienen bioactividad tipo fitohormonas.

4. MÉTODOS

4.1. Preparación de la muestra

4.1.1. Colecta

La colecta de las macroalgas *Chondracanthus chamissoi* (C. Agardh) Kützinger (fig. 1C), *Ulva nematoidea* Bory de Saint-Vincent (fig. 1D), *Lessonia trabeculata* Villouta y Santelices (fig. 1E) y *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (fig. 1F) se realizó en el intermareal rocoso (fig. 1B) de tres lugares de la costa peruana (fig. 1A, tabla 1), eligiendo los días en que coincidían la baja marea en el transcurso de 7-9 a. m. para hacer la colecta en el intermareal. La especie *L. trabeculata* que se encontraba en el submareal, fue colectada material varado fresco. Todas fueron lavadas *in situ* con agua de mar, cada especie por separado para eliminar restos no deseados de arena y epífitos, luego colocadas en bolsas nuevas de polietileno e inmediatamente dentro de una cámara de conservación a 15 ± 1 °C durante su transporte al Laboratorio de Ficología Marina de la UNMSM.

Tabla 1. Lugares de colecta de las macroalgas.

Macroalga	Localidad	Coordenadas
<i>Chondracanthus chamissoi</i>	Playa Hermosa (Ancón, Lima)	11°46'19"S, 77°11'08"W
<i>Ulva nematoidea</i>	Playa Conchitas (Barranco, Lima)	12°09'12"S, 77°01'32"W
<i>Lessonia trabeculata</i>	Playa Mendieta (Pisco, Ica)	14°03'07"S, 76°16'46"W
<i>Macrocystis pyrifera</i>	Playa Mendieta (Pisco, Ica)	14°03'07"S, 76°16'46"W

4.1.2. Procesamiento

En el laboratorio, una parte de las muestras fue separada para su montaje y posterior identificación. Las macroalgas se lavaron rápidamente con agua de caño para evitar daño celular, se extendieron sobre papel “Kraft” y bajo sombra con la finalidad de orearlas. Para el secado, las macroalgas fueron colocadas sobre 2 capas de gasa dentro de la estufa (anexo 2) por 5 h a 50 °C (Rama-Rao 1990), e inmediatamente molidas (en el caso de *M. pyrifera* y *L. trabeculata* se utilizaron sólo filoides) en un molino (anexo 2) y tamizadas en un tamiz de plástico de 500 µm. Los polvos, tanto fino como grueso, se almacenaron por separado en bolsas herméticas con deshumecedor (fig. 3).

4.1.3. Preparación del extracto acuoso de macroalgas

Utilizando la metodología de Rama-Rao (1990), modificada por Sridhar y Rengasamy (2010), fue pesado 1.0 g del alga pulverizada fina (fig. 2A) y diluido en 20 ml de agua destilada en un matraz de 100 ml (fig. 2B). La extracción en caliente se realizó a 121 °C, 15 lbs durante 30 minutos en la autoclave (fig. 2C). Enseguida, el extracto fue filtrado en caliente con 4 capas de tela organza (fig. 2D) y enrazado el volumen a 20 ml con agua destilada estéril. El volumen fue distribuido en dos tubos de centrifugación de 10 ml y centrifugados a 2500 rpm durante 10 minutos (fig. 2E). El sobrenadante permaneció almacenado en refrigeración, en un tubo de ensayo con tapa rosca estéril (fig. 2F), hasta el momento de su uso. Este concentrado es el stock 100% (equivalente a 50 mg de alga seca pulverizada por 1 ml de agua destilada), a partir del cual fueron preparadas las concentraciones: 10, 5, 2.5 y 1.25% (fig. 3).



Figura 1. Macroalgas, colecta y lugares de colección. A) Lugares de colección. B) Colecta de macroalgas en el intermareal rocoso. C) *C. chamissoi*. D) *U. nematoidea*. E) *L. trabeculata*. F) *M. pyrifera*.

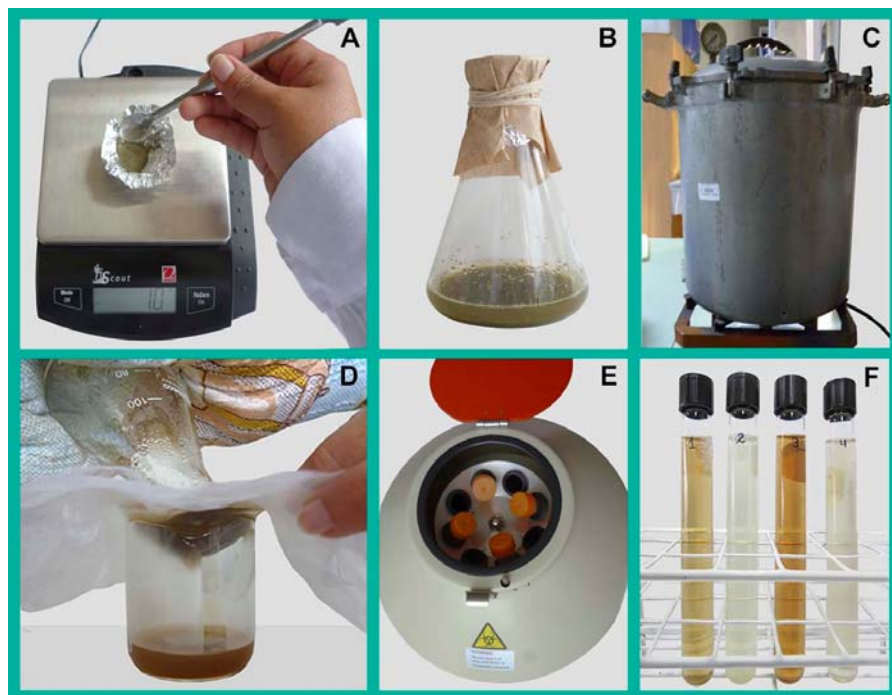


Figura 2. Preparación del extracto acuoso. A) Pesado de 1g de alga pulverizada (<500 μ m). B) Dilución del alga en 20 ml de agua destilada en un matraz de 100 ml. C) Extracción en caliente a 121 °C, 15 lbs por 30 min. D) Filtración del extracto en 4 capas de tela organza. E) Centrifugación del extracto filtrado a 2500 rpm por 10 min. F) Enrazado a 20 ml y almacenamiento del sobrenadante (100%) en tubos de tapa rosca.

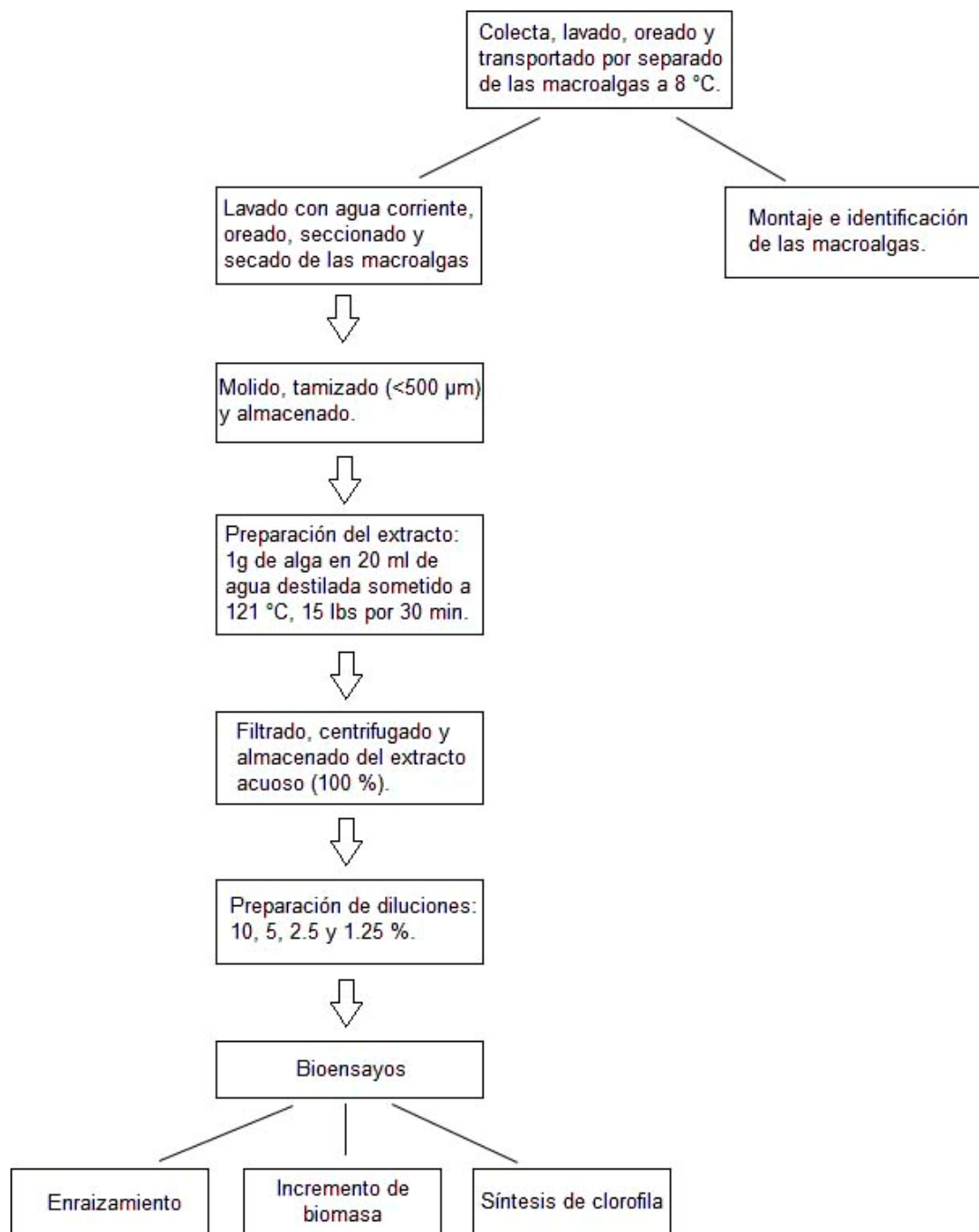


Figura 3. Diagrama de procedimientos realizados para los bioensayos con extractos acuosos de macroalgas.

4.2. Preparación de los estándares

4.2.1. Bioactividad tipo auxina-enraizamiento

La fitohormona ácido indol-3-acético (IAA. Anexo 2) fue retirada de su almacenamiento en congelación, y con ayuda de una espátula y sobre papel aluminio, se pesaron 20 mg de hormona en la balanza (anexo 2). El volumen pesado fue vertido en un vaso de precipitado, disuelto en unas gotas de NaOH 1N y diluido en 20 ml de agua destilada estéril para obtener una concentración stock de 1000 ppm, el cual fue almacenado en 2 frascos ámbar de 10 ml cada uno y en congelación.

Para la preparación de los tratamientos de estandarización (volumen 3 ml), primero se rotularon 14 tubos de ensayo y se prepararon las diluciones: 400, 300, 200, 100 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 y 0 ppm utilizando como solvente agua destilada estéril.

4.2.2. Bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa

Se preparó el stock Kinetina de concentración 1000 ppm, para ello fueron pesados 20 mg de la fitohormona (anexo 2). El volumen pesado fue vertido en un vaso de precipitado, disuelto en unas gotas de NaOH 1N y diluido en 20 ml de agua destilada estéril para obtener una concentración stock de 1000 ppm, el cual fue almacenado en 2 frascos ámbar de 10 ml cada uno y en congelación.

Para la preparación de los tratamientos de estandarización (volumen de 3 ml), primero se rotularon 10 tubos de ensayo y se prepararon las diluciones: 500, 300, 200, 100, 60, 30, 10, 6, 3 y 0 ppm utilizando como solvente agua destilada estéril.

4.2.3. Bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila

A partir del stock kinetina 1000 ppm, elaborado en el procedimiento anterior (4.2.1-b), se prepararon 5 ml de las diluciones 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 y 0 ppm, utilizando como solvente agua destilada estéril, y en tubos de ensayo (estériles y rotulados). Cada tubo fue agitado manualmente para lograr una mezcla uniforme y el stock retornado a congelación para su conservación. Se agregaron 3 ml de cada dilución por placa.

4.3. Metodología aplicada para los ensayos de bioactividad

4.3.1. Bioactividad tipo auxina-enraizamiento y citoquinina-incremento de biomasa

a) Preparación de material

Inició con la preparación de los materiales de vidrio, un día antes de la instalación de los bioensayos.

Las placas petri utilizadas fueron de dimensiones y características similares (90 mm de diámetro), lavadas con un detergente neutro y enjuagadas varias veces con agua de caño hasta quitar todo resto de detergente, y al final con agua destilada. Se secaron en la estufa a 60 °C, se empacaron con doble capa de papel "kraft" y se esterilizaron por 15 minutos en la autoclave (121 °C, 15 lbs) junto con pipetas, pinzas de 20 cm, mangos de bisturí, y después secados en la estufa a 80 °C.

b) Método del disco de papel

El método del disco de papel, aplicado y mejorado por Zhao *et al.* (1992), se aplicó en las pruebas de bioactividad tipo auxina-enraizamiento y citoquinina-incremento de biomasa.

El procedimiento metodológico inició con el acondicionamiento de la mesa de trabajo, limpiando con detergente y alcohol 96°. Se colocó 1 disco de papel filtro (anexo1) en cada placa petri estéril y se rotuló un total de 6 placas por tratamiento. Con un lápiz fue marcada una línea de 5 mm cerca del borde del papel, para que al momento de instalar y evaluar los cotiledones, sea fácil el reconocimiento de la secuencia de cada cotiledón en la placa. Continuando con el procedimiento, se agregaron 400 µl de solución, ya sea hormona o extracto o agua destilada estéril, con la micropipeta (anexo 2) y sobre el disco de papel. Habiendo esperado 5 minutos para que el solvente difunda por completo (este procedimiento garantiza que la sustancia bioactiva sea distribuida de manera uniforme sobre el disco de papel filtro y no precipite), las placas fueron colocadas en la estufa a 50 °C por 20 minutos para evaporar el solvente. En seguida, se agregaron 4 ml de agua destilada estéril a cada placa. Con este último procedimiento, la concentración de cada tratamiento fue reducida a la décima parte: IAA-enraizamiento (40, 30, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 y 0 ppm), Kinetina-incremento de biomasa (50, 30, 20, 10, 6, 3, 1, 0.6, 0.3 y 0 ppm) y los extractos acuosos (10, 5, 2.5, 1.25 y 0%). En los ensayos de estandarización de fitohormonas y con extractos de macroalgas, se instalaron 30 cotiledones distribuidos en 6 réplicas (placas) de 5 cotiledones cada una, por concentración ensayada.

4.3.2. Bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila

En el ensayo de bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila, se utilizó la metodología de Fletcher y McCullagh (1971).

Se usaron placas nuevas de plástico de 60 mm de diámetro, previamente limpiadas con algodón y alcohol 96°. Estas fueron rotuladas y con una pipeta fueron agregados 3 ml de concentración preparada (kinetina o extracto o agua destilada). La instalación del material biológico se realizó siguiendo el procedimiento 4.4.3-b. Se instalaron 6

cotiledones por placa (una placa por concentración), y se dejaron en la incubadora (anexo 2) a 26 °C durante 16 h y en oscuridad. Cumplido el período, las placas con los cotiledones fueron expuestas a luz artificial, con rango de intensidad: 26-32 $\mu\text{mol m}^{-1}\text{s}^{-1}$, durante 6 h. Después de la exposición, cada cotiledón fue retirado de la placa con bastante cuidado, secado en papel toalla y molido en un mortero de porcelana. Se lavaron 3 veces con acetona (80%), los volúmenes sucesivos fueron: 1.5, 1.5 y 2 ml, obteniendo un volumen final de 5 ml en un tubo de centrifugación de 10 ml. Se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, siendo guardado cada tubo en oscuridad y refrigeración hasta la culminación de la extracción de todos los cotiledones. La lectura de absorbancia fue a 664 nm en el espectrofotómetro (anexo 2), siendo el blanco acetona (80%). Cabe señalar que se utilizaron cubetas de vidrio para las lecturas, las mismas que fueron enjuagadas con agua destilada al término de cada lectura.

4.4. Ensayos de bioactividad en cotiledones de *Cucumis sativus*

4.4.1. Material biológico

Se utilizó la especie *Cucumis sativus* (anexo 2), en consideración a los antecedentes acerca de su uso como material biológico en pruebas de ensayo sensibles a bajas concentraciones de fitohormonas y de resultado rápido (Fletcher y McCullagh 1971; Zhao *et al.* 1992).

4.4.2. Calibración y ajustes de muestras

a) Germinación de semillas de *Cucumis sativus*

En primer lugar, las bandejas de plástico, de dimensiones 35 x 25 x 5 cm, fueron lavadas con detergente neutro y enjuagadas varias veces con agua de caño y un enjuague final con agua destilada.

Se evaluaron dos métodos de germinación: el primero fue siguiendo el protocolo de Zhao *et al.* 1992, para el cual se preparó agar (anexo 2) al 0.7% y se agregó, en caliente, a la bandeja hasta una altura de 2 cm, dejándose enfriar para que tomara consistencia. El segundo método consistió en colocar tres capas de papel toalla doble hoja en la bandeja y añadir 200 ml de agua de caño a 16 °C, logrando humedecer por completo el papel.

Respecto del proceso de siembra, las semillas se vaciaron del envase hacia una placa petri, y con una pinza se fueron colocando en la bandeja con agar y también en la bandeja con papel toalla humedecido (cada semilla a una distancia uniforme de 1 cm); en ambos casos se sembraron 100 semillas. Enseguida, las bandejas fueron colocadas en completa oscuridad dentro de la incubadora (anexo 2) a 26 °C durante 3 días. Se evaluó el número de semillas germinadas, considerándose como semilla germinada aquella que presentaba una radícula mayor o igual a los 2 mm de longitud.

b) Determinación de la edad de los cotiledones para la instalación de los bioensayos

Se realizaron dos ensayos con extractos de *M. pyrifera* (0, 1.25, 2.5, 5 y 10%) y se aplicó el método del disco de papel (procedimiento 4.3.1.b), utilizando cotiledones etiolados de 6 y 8 días de edad, se registraron los pesos iniciales y se instaló un total de 15 cotiledones por concentración (distribuidos en 3 placas cada una con 5 cotiledones), enseguida colocadas en oscuridad a 26 °C dentro de la incubadora; y después de cuatro días de prueba fueron registrados los pesos finales de cada cotiledón, comparándose la variable incremento de biomasa entre los tratamientos.

c) Determinación del número de días de evaluación

Se realizaron dos ensayos utilizándose cotiledones etiolados de 6 días edad, y los extractos de *M. pyrifera* que fueron aplicados en las placas a través del método de disco

de papel (procedimiento 4.3.1.b). Anotándose los pesos iniciales, fue instalado un total de 15 cotiledones por concentración (distribuidos en 3 placas cada una con 5 cotiledones) y colocados en oscuridad a 26 °C en la incubadora.

El primer ensayo fue evaluado al cuarto día de instalación y, el segundo, al octavo día, anotándose los pesos finales para cada cotiledón y comparándose la variable incremento de biomasa entre los tratamientos.

d) Estandarización de pesos

Aplicando el método del papel toalla se pusieron a germinar 180 semillas de *Cucumis sativus* (fig. 4A); el nivel de humedad del papel se igualó cada dos días en oscuridad, el día 2 se niveló con 50 ml, aquí las plántulas tenían una altura de 0.5-2 cm (fig. 4B); el día 4, con 150 ml y las plántulas tenían una altura de 4-6 cm (fig. 4C). Luego de 6 días (fig. 4D), se retiró la bandeja de germinación de la incubadora y se cortó plántula por plántula (con base en el método de barrido ordenado), cada explante 5 cm por debajo de los cotiledones (fig. 4E), colocándolos en placas limpias y cortándose el hipocotilo y todo resto de tejido meristemático apical del cotiledón con ayuda de una hoja de bisturí (fig. 4F). Los cotiledones permanecían unidos por el haz; por ello, con ayuda de la hoja de bisturí y con bastante cuidado, se procedió a separarlos (fig. 4G). Cada cotiledón fue pesado rápidamente en la balanza (fig. 4H), para evitar la deshidratación del tejido y cavitación (en total de 300 cotiledones).

4.4.3. Instalación de material biológico

El proceso de instalación del material biológico inició con el acondicionado de la mesa de trabajo. El procedimiento fue llevado a cabo al cumplir 6 días de edad los cotiledones y en un cuarto oscuro con iluminación de una lámpara de luz verde 66 para evitar el de-etiolado. Cada cotiledón fue pesado y rápidamente colocado en la placa sobre el disco de

papel, para evitar su deshidratación y cavitación. Se colocaron 5 cotiledones por placa, y un total de 6 placas (réplicas) por concentración de fitohormona o extracto de macroalgas o agua destilada. Los cotiledones fueron distribuidos uniformemente en toda el área del disco de papel filtro. El cotiledón número 1 fue colocado a la altura de la línea de 5 mm marcada con lápiz en la instalación de las placas, a partir del cual fueron colocándose los demás cotiledones en sentido horario (fig. 4I). Una vez terminada la instalación, las placas se trasladaron hacia la incubadora y dejaron en oscuridad a 26 °C. El tiempo para cada ensayo fue de 8 días (bioactividad tipo auxina-enraizamiento y citoquinina-incremento de bioma) y 16 h (bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila).

4.5. Análisis de las muestras

4.5.1. Análisis primario

En una hoja de cálculo se realizó los análisis de datos, valores máximos y mínimos, además de frecuencias de pesos iniciales y finales.

4.5.2. Análisis estadístico

Se determinaron los estadísticos: media y error típico de cada tratamiento. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se determinó el nivel de significancia de la bioactividad tipo fitohormona, y en los análisis de comparación múltiple posterior al ANOVA se utilizó la prueba Scheffé (comparación simultánea de más de dos medias).

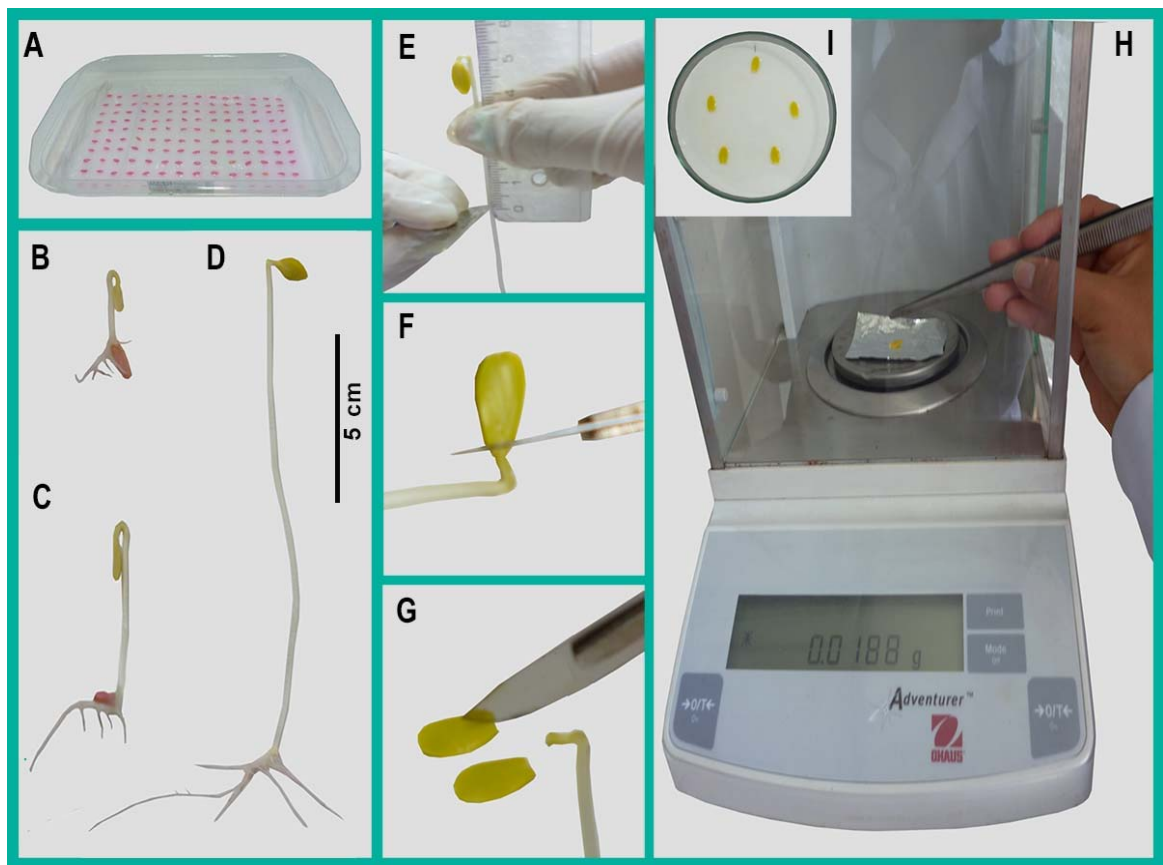


Figura 4. Obtención de cotiledones para bioensayos. A) Fuente de germinación con papel toalla humedecido y con semillas distribuidas 1 cm entre ellas. B) Plántula de 2 días de edad. C) Plántula de 4 días de edad. D) Plántula de 6 días de edad. E) Obtención de explantes de 5 cm por debajo de los cotiledones. F) Obtención de cotiledones cortando a 2 mm de su base para eliminar todo resto de tejido meristemático apical. G) Separación de cotiledones que permanecían unidos por el haz. H) Pesado del cotiledón en la balanza de precisión. I) Disposición de los cotiledones sobre la placa con papel filtro.

5. RESULTADOS

5.1. Estandarización de la metodología para el manejo de muestras en los bioensayos

5.1.1. Germinación de semillas de *Cucumis sativus*

De los ensayos de germinación de semillas de *Cucumis sativus*, el método en papel toalla humedecido logró mayor porcentaje de germinación (85%) y uniformidad en el tamaño de plántulas y el peso de los cotiledones, tres variables importantes para realizar con eficacia y eficiencia los bioensayos de prueba de bioactividad. Mientras que, aplicando el método en agar (0.7%), el resultado obtenido fue de un bajo porcentaje de germinación (20%) y alta variabilidad en el tamaño de plántulas y peso de cotiledones (fig. 5A).

5.1.2. Determinación de la edad de los cotiledones para la instalación de los bioensayos

De los ensayos para la determinación de la edad de los cotiledones, se observó que aquellos que tenían 6 días de edad presentaban un estado de desarrollo adecuado para la prueba de bioactividad de los extractos de *M. pyrifera* (1.25, 2.5, 5 y 10 %), pues lograron mayor incremento de su biomasa, por lo que el rendimiento de los extractos fue diferenciado del control negativo (T). En el caso de los cotiledones etiolados de 8 días de edad, no se logra diferenciar estadísticamente el efecto respecto del control negativo (fig. 5C).

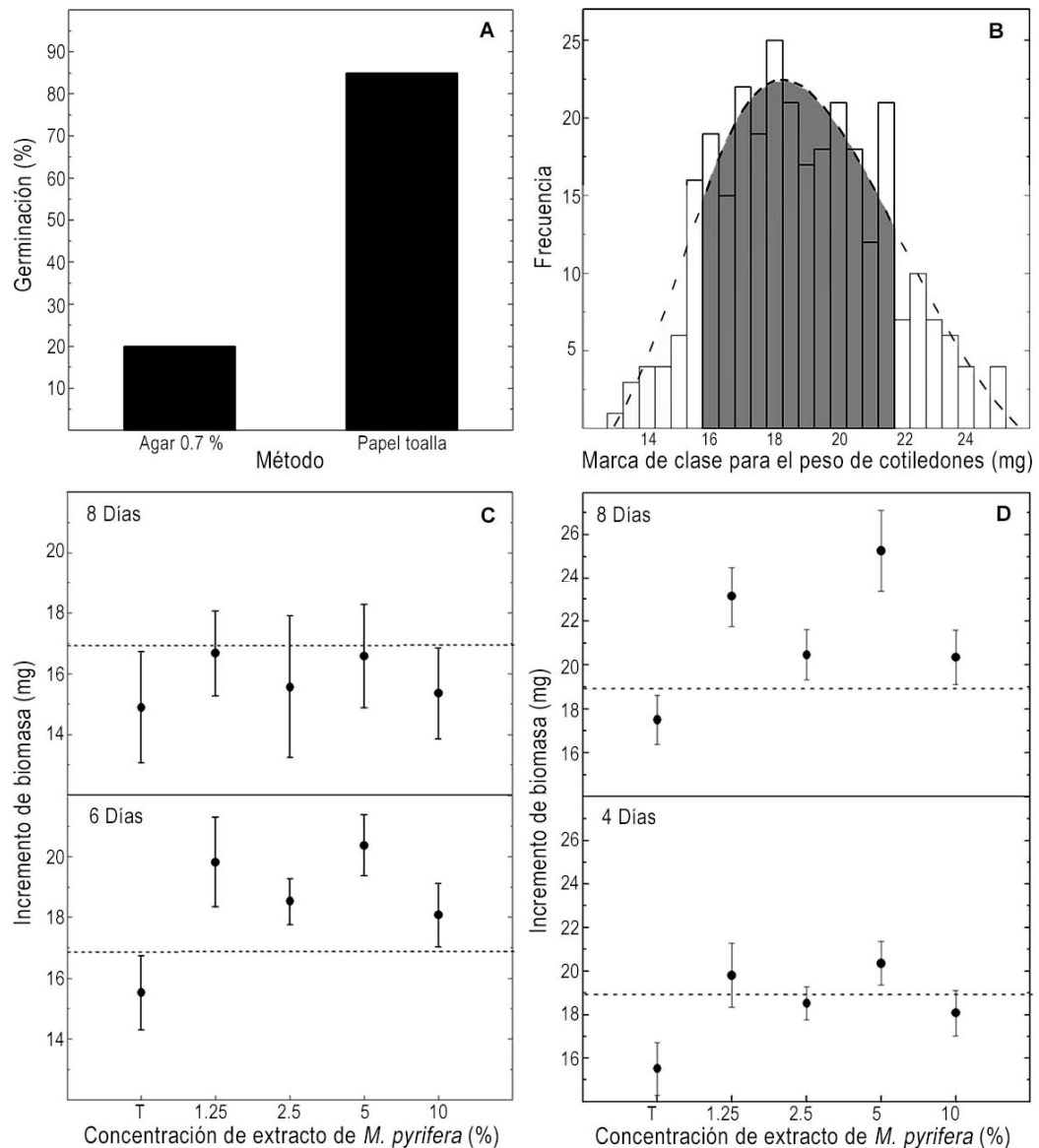


Figura 5. Cualidades de *Cucumis sativus* para el bioensayo. A) Porcentaje de germinación en semillas de *Cucumis sativus* a los 3 días y aplicando los métodos en agar 0.7% y papel toalla. B) Distribución de frecuencias del peso inicial de cotiledones de 6 días de edad. En color oscuro se muestra el promedio, más menos una desviación estándar (66 % de la población). C) Incremento de biomasa en cotiledones de 6 y 8 días de edad tratados con extracto de *M. pyrifera*. D) Incremento de biomasa en cotiledones de 6 días de edad tratados con extracto de *M. pyrifera*, y evaluados al cuarto y octavo día.

5.1.3. Determinación del tiempo de tratamiento

En los ensayos de determinación del tiempo de tratamiento, 8 días muestra un incremento de la biomasa de los cotiledones tratados con extractos de macroalgas evidenciando diferencias entre los controles y los tratamientos. El control negativo logró un incremento de 17.5 ± 11 mg del peso fresco, mientras que los tratamientos con extracto de macroalgas muestran entre 20.3 ± 1.2 mg hasta 25.2 ± 1.8 mg de biomasa (fig. 5D).

Si bien es cierto el incremento de biomasa de los cotiledones tratados con extractos de macroalgas y evaluados al cuarto día (de 20.4 ± 1.0 mg hasta 18.1 ± 1.1 mg) fue superior al control negativo (15.5 ± 1.2 mg), no hay diferencias estadísticamente significativas.

5.1.4. Determinación del rango de peso inicial en cotiledones etiolados

En el ensayo para determinar el rango de peso inicial de los cotiledones etiolados de 6 días de edad, el peso mínimo registrado fue 13.2 mg y, el máximo, 25.4 mg, con una media aritmética de $19.0 \text{ mg} \pm 2.6$. Se graficó la campana de Gauss y se consideró como rango el 66% de la población estadística de los pesos registrados, es decir, los que se encuentran dentro de una desviación estándar de la media: entre 16.4 mg y 21.6 mg (fig. 5B).

5.2. Estandarización de hormonas

5.2.1. Ácido indol-3-acético IAA (auxina-enraizamiento)

Los cotiledones etiolados sometidos a diferentes concentraciones de la fitohormona IAA, desarrollaron raíces adventicias a partir del quinto día de tratamiento, y el día de

evaluación (día 8) estas eran delgadas y medianas en longitud (menores a 15 mm); además, solo se observó el desarrollo de raíces principales, mas no de raíces laterales (fig. 9). La concentración óptima fue 40 ppm con una media de raíces de 4.2 ± 1.8 , pudiendo este tratamiento ser referente como control positivo. Otro pico de bioactividad fue observado a 4 ppm con una media de 3.0 ± 1.3 (fig. 6). Los cotiledones del control negativo desarrollaron pocas raíces, con una media de 1.2 ± 0.2 raíces, formando un grupo homogéneo diferente a las concentraciones 2, 4, 6, 20 y 30 ppm en el análisis de comparación múltiple (tabla 2). No se evidenció formación de callos, ni diferencias significativas respecto del incremento de biomasa.

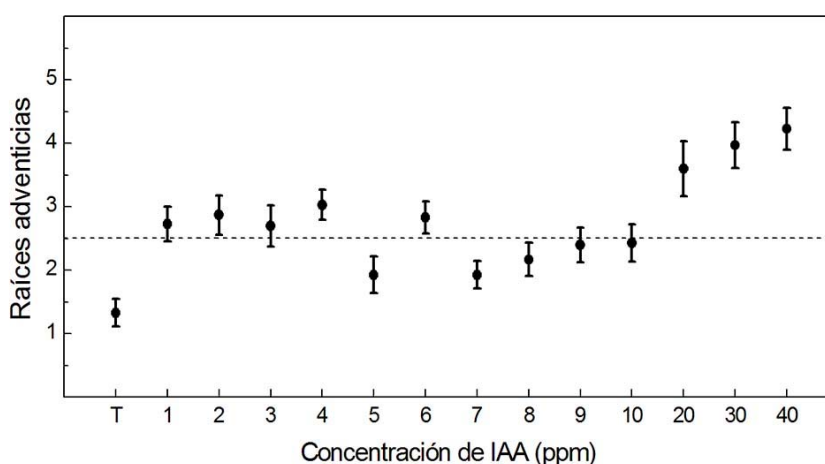


Figura 6. Estandarización de IAA–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias; la línea punteada separa las concentraciones que forman un grupo homogéneo (lado superior) diferente del control negativo (T).

Tabla 2. Estandarización de IAA–enraizamiento. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos.

IAA (ppm)	Subconjuntos para alfa = 0.05	
	1	2
0	1.2	
6		2.8
2		2.9
4		3.0
20		3.6
40		4.2
Sig.	1.00	0.26

5.2.2. Kinetina (citoquinina-incremento de biomasa)

Los tratamientos con la hormona kinetina mostraron un incremento en la biomasa de los cotiledones. El mayor pico de bioactividad se registró en la concentración 30 ppm con una media de 26.3 ± 1.1 mg (fig. 7), observándose cotiledones de bordes extendidos y curvados (fig. 9), pudiendo este tratamiento ser referente como control positivo. Las concentraciones 20 y 50 ppm también estimularon un incremento importante de biomasa: 21.7 ± 0.6 mg y 24.5 ± 1.0 mg, respectivamente. El crecimiento de los cotiledones tratados con 6 y 10 ppm fue intermedio respecto de la bioactividad de las demás concentraciones. El incremento de biomasa en las concentraciones 0.3, 0.6 y 1 ppm fue mínimo, formando un grupo homogéneo junto el control negativo en el análisis de comparación múltiple (tabla 3). El control negativo (T) registró la menor media, 12.1 ± 0.4 mg, y a diferencia de los tratamientos con la fitohormona, no se observaron bordes curvados en los cotiledones. Ninguno de los tratamientos con kinetina presentó desarrollo de raíces adventicias, ni de callos, ni daño alguno sobre los cotiledones (fig 9).

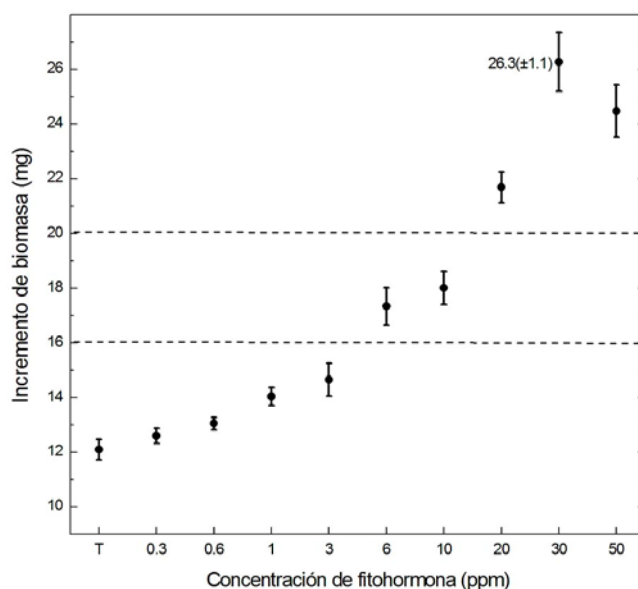


Figura 7. Estandarización de Kinetina-incremento de biomasa. Gráfico de medias para la variable incremento de biomasa de los cotiledones tratados con Kinetina. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 3. Estandarización de Kinetina-incremento de biomasa. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos.

Concentración	Subconjunto para alfa = 0.05		
	1	2	3
0	12.1		
0.3	12.6		
0.6	13.0		
1	14.1		
6		17.3	
10		18.3	
50			24.5
30			26.3
Sig.	0.33	1.00	1.00

5.2.3. Kinetina (citoquinina-síntesis de clorofila)

Los tratamientos concentrados de la fitohormona kinetina estimularon el de-etiolado de los cotiledones cuantificado en términos de absorbancia a 664 nm, de los cuales, la concentración 10 ppm registró el más alto valor de absorbancia: 0.045 ± 0.003 , pudiendo ser un referente como control positivo (fig. 8). Para las concentraciones 0.1 y 1 ppm, las medias de absorbancia fueron 0.027 ± 0.003 y 0.032 ± 0.004 respectivamente, en ambos tratamientos se observó un ligero de-etiolado de los cotiledones, y según el análisis de comparación múltiple estas concentraciones forman un mismo grupo homogéneo (tabla 4). Los cotiledones tratados con las concentraciones 0.001 y 0.01 ppm permanecieron etiolados, similar al tratamiento control negativo (T).

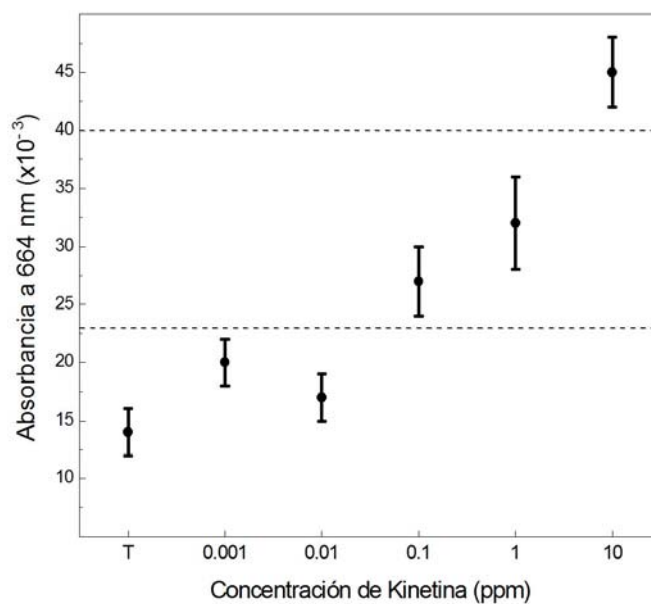


Figura 8. Estandarización de Kinetina–síntesis de clorofila. Gráfico de medias de la síntesis de clorofila, cuantificado en términos de absorbancia a 664 nm. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 4. Estandarización de Kinetina–síntesis de clorofila. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos.

Kinetina (ppm)	Subconjuntos para alfa = 0.05		
	1	2	3
T	0.014		
0.01	0.017		
0.001	0.020		
0.1		0.027	
1		0.032	
10			0.045
Sig.	0.65	0.39	1.00

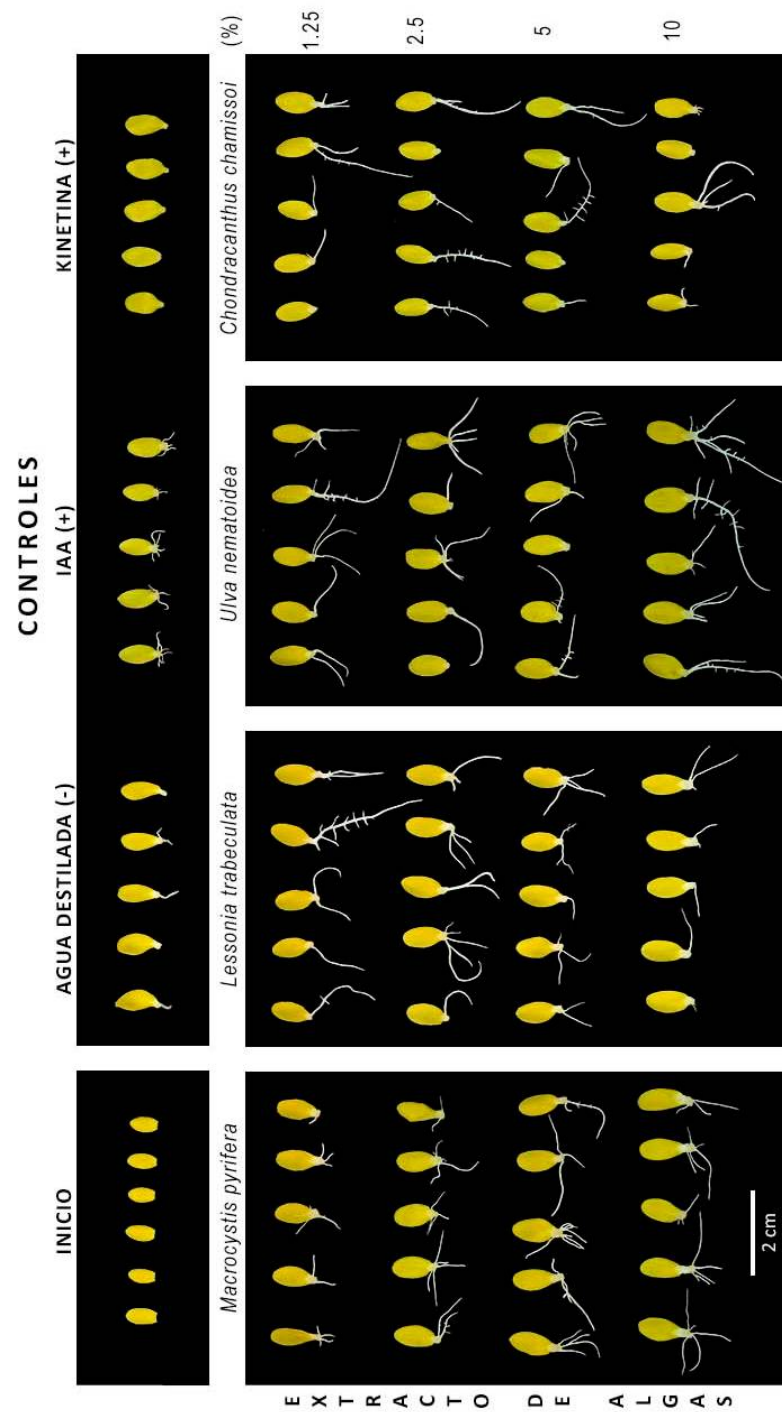


Figura 9. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento y citoquinina–incremento de biomasa de los tratamientos con fitohormonas, agua destilada y extractos de macroalgas sobre cotiledones de *Cucumis sativus*.

5.3. Medición de la bioactividad de los extractos de macroalgas

5.3.1. Bioactividad tipo auxina-enraizamiento

a) Extracto de *Ulva nematoidea*

Todos los tratamientos de extracto de alga ensayada estimularon el desarrollo de raíces adventicias sobre los cotiledones (fig. 9), determinándose diferencias significativas entre los tratamientos en el análisis de varianza (tabla 5). La óptima bioactividad fue con el extracto diluido al 10% (fig. 10), donde se pudo observar la aparición de raíces a los tres días de haber iniciado el ensayo, logrando alcanzar longitudes de hasta 40 mm el día de la evaluación. En el análisis de comparación múltiple posterior al ANOVA, las diluciones de extracto al 2.5% (2.6 ± 0.3 raíces), 5% (2.9 ± 0.5 raíces) y 10% (3.5 ± 0.4 raíces) formaron un grupo homogéneo diferente al tratamiento control negativo (0.8 ± 0.2 raíces. Tabla 6).

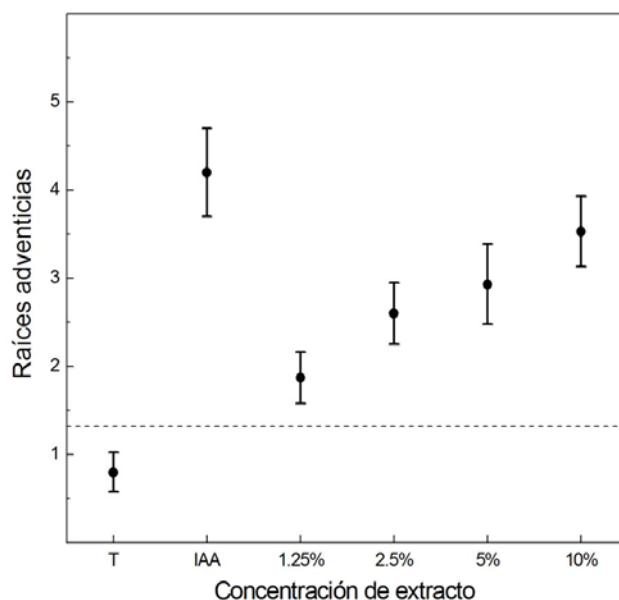


Figura 10. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de *U. nematoidea*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 5. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extracto de *U. nematoidea*.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	66.587	4	16.647	8.936	0.000
Intra-grupos	130.400	70	1.863		
Total	196.987	74			

Tabla 6. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable número de raíces adventicias, en cotiledones tratados con extractos de *U. nematoidea*.

Concentración	Subconjunto para alfa = 0.05	
	1	2
0	0.8	
2.5 %		2.6
5 %		2.9
10 %		3.5
Sig.	1.00	0.36

b) Extracto de *Macrocystis pyrifera*

Todos los tratamientos con el extracto del alga *M. pyrifera* promovieron mayor desarrollo de raíces adventicias (fig. 9), determinándose diferencias significativas en el análisis de varianza (tabla 7). Las concentraciones 2.5 y 10% mostraron los mejores resultados, ambos con un promedio de 4.1 ± 0.5 y 4.1 ± 0.4 raíces, respectivamente (fig. 11). En todos los tratamientos, el desarrollo de las primeras raíces fue observado al cuarto día del ensayo, y el día de la evaluación, octavo día, algunas presentaban raíces laterales. Las concentraciones 1.25 y 5% también muestran resultados importantes de la media: 3.5 ± 0.5 raíces y 3.8 ± 0.4 raíces, respectivamente. En el análisis de comparación múltiple posterior al ANOVA, los cuatro tratamientos del extracto de alga ensayada formaron un grupo homogéneo diferente al control negativo (0.8 ± 0.2 raíces. Tabla 8).

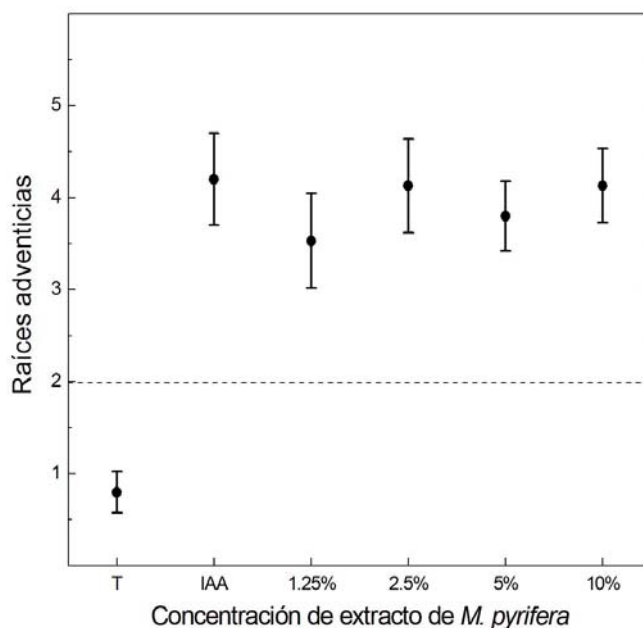


Figura 11. Bioactividad tipo auxina–enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de *M. pyrifera*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 7. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extracto de *M. pyrifera*.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	119.120	4	29.780	11.329	0.000
Intra-grupos	184.000	70	2.629		
Total	303.120	74			

Tabla 8. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable número de raíces adventicias, en cotiledones tratados con extractos de *M. pyrifera*.

Concentración	alfa = 0.05	
	1	2
T	0.8	
1.25%		3.5
5%		3.8
2.50%		4.1
10%		4.1
Sig.	1.00	0.91

c) Extracto de *Lessonia trabeculata*

Todos los tratamientos con el extracto del alga *L. trabeculata* estimularon mayor desarrollo rizogénico (fig. 9), determinándose diferencias significativas en el análisis de varianza (tabla 9). El resultado de la concentración 2.5% fue el mayor promedio: 3.0 ± 0.3 raíces, mientras que en las concentraciones del 5% (2.7 ± 0.3 raíces) y 10% (2.5 ± 0.3 raíces) hubo una ligera disminución de la media (fig. 12). En todos los tratamientos, la aparición de las primeras raíces fue observada al cuarto día de ensayo, y algunas lograron desarrollar pequeñas y delgadas raíces laterales el día de evaluación (fig. 9). En el análisis de comparación múltiple posterior al ANOVA, los tratamientos 2.5, 5 y 10%, forman un mismo grupo homogéneo diferente del control negativo (tabla 10).

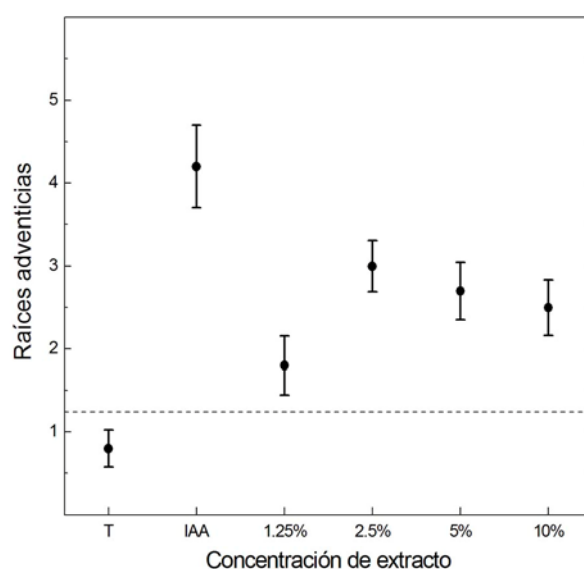


Figura 12. Bioactividad tipo auxina—enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de *L. trabeculata*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 9. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extracto de *L. trabeculata*.

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	46.613	4	11.653	7.735	0.000
Intra-grupos	105.467	70	1.507		
Total	152.080	74			

Tabla 10. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable número de raíces adventicias en cotiledones tratados con extractos de *L. trabeculata*.

Concentración	alfa = 0.05	
	1	2
T	0.8	
10%		2.5
5%		2.7
2.50%		3
Sig.	1.00	0.68

d) Extracto de *Chondracanthus chamissoi*

Los cotiledones tratados con los extractos de *C. chamissoi* formaron raíces adventicias con medias desde 1.3 ± 0.1 raíces (al 1.25%) hasta 1.6 ± 0.3 raíces (al 10%), observándose el desarrollo de las primeras raíces al quinto día de ensayo (fig. 9); mientras que el control negativo tuvo una media de 0.8 ± 0.2 raíces (fig. 13). Aunque se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos con el alga respecto del control negativo, no se determinaron diferencias significativas en el análisis de varianza.

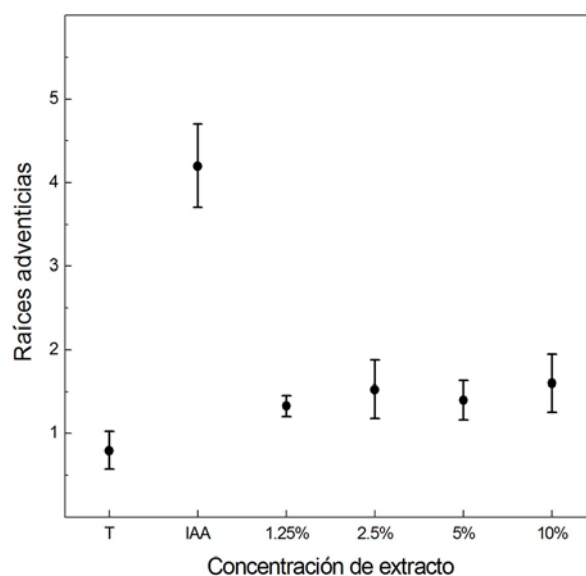


Figura 13. Bioactividad tipo auxina—enraizamiento. Gráfico de medias para la variable número de raíces adventicias desarrolladas en cotiledones tratados con extractos acuosos de *C. chamissoi*.

5.3.2. Bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa

a) Extracto de *Ulva nematoidea*

Los tratamientos con extractos de *U. nematoidea* estimularon el incremento de la biomasa en los cotiledones. La concentración del alga al 10% registró el mayor incremento de la biomasa: 20.0 ± 1.3 mg, y en algunos cotiledones se pudieron notar bordes extendidos y curvados (fig. 9). Los resultados de las concentraciones 1.25% (15.7 ± 0.9 mg), 2.5% (16.3 ± 0.9 mg) y 5% (17.5 ± 1.1 mg) muestran un incremento lineal de la biomasa; mientras que en el control negativo el incremento fue menor (14.4 ± 0.8 mg) (fig. 14), determinándose diferencias significativas al realizar el análisis de varianza (tabla 11). Posterior al ANOVA, el análisis de comparación múltiple determina que las concentraciones 5 y 10% forman un grupo homogéneo diferente al control negativo (tabla 12).

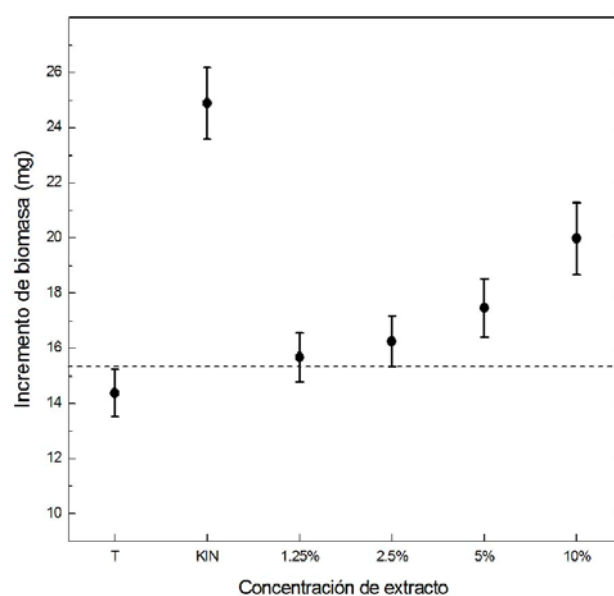


Figura 14. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de *U. nematoidea*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 11. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de *U. nematoidea*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	269.871	4	67.468	4.346	0.003
Intra-grupos	1086.595	70	15.523		
Total	1356.466	74			

Tabla 12. Prueba Scheffé al 0.15, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extractos de *U. nematoidea*.

Concentración	alfa = 0.15	
	1	2
T	14.4	
5%		17.5
10%		20.0
Sig.	1.00	0.27

b) Extracto de *Macrocystis pyrifera*

Los tratamientos con extractos de *M. pyrifera* estimularon el incremento de la biomasa en los cotiledones (fig. 9), determinándose diferencias significativas en el análisis de varianza (tabla 13). La concentración del alga al 10% obtuvo el mayor incremento de la biomasa: de 22.7 ± 0.8 mg (fig. 15). Conforme la concentración fue disminuyendo, también se observó una disminución de la media: 5% (21.3 ± 1.4 mg), 2.5% (18.5 ± 0.8 mg), 1.25% (15.2 ± 0.7 mg) y el control negativo (14.4 ± 0.8 mg). Posterior al ANOVA, el análisis de comparación múltiple determina que las concentraciones 2.5, 5 y 10% están dentro de un mismo grupo homogéneo separado del control negativo (tabla 14).

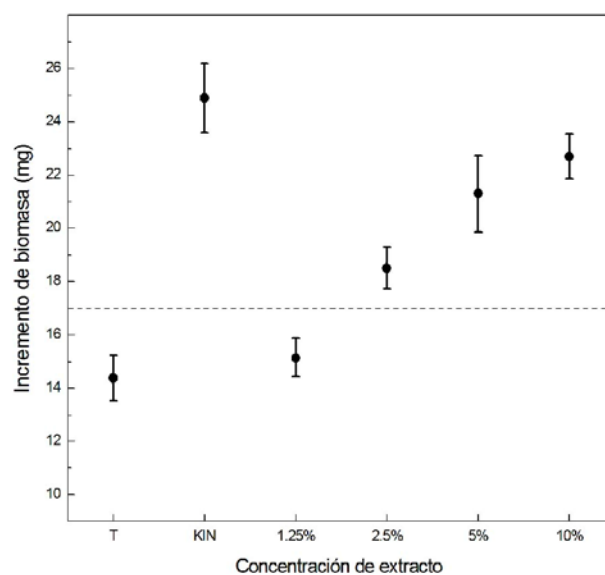


Figura 15. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de *M. pyrifera*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 13. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de *M. pyrifera*.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	804.763	4	201.191	14.449	0.000
Intra-grupos	974.700	70	13.924		
Total	1779.463	74			

Tabla 14. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa, en cotiledones tratados con extractos de *M. pyrifera*.

Concentración	alfa = 0.05	
	1	2
T	14.4	
5%		21.3
10%		22.7
Sig.	1.00	0.66

c) Extracto de *Lessonia trabeculata*

Los cotiledones tratados con extracto de *L. trabeculata* incrementaron su biomasa (fig. 9), hallándose diferencias significativas en el análisis de varianza (tabla 15). Un óptimo resultado se obtuvo al 10% con una media de 22.1 ± 0.8 mg en el incremento del peso fresco por cotiledón. Conforme fue disminuyendo la concentración, también hubo una disminución de la media (fig. 16), es así que la dilución al 5% tuvo un incremento de 19.1 ± 1.4 mg, al 2.5%: 18.1 ± 1.9 mg, al 1.25%: 15.5 ± 0.5 mg. y el control negativo: 14.4 ± 0.8 mg. El análisis de comparación múltiple determinó que los tratamientos al 5 y 10% están dentro de un grupo homogéneo separado del control negativo (tabla 16).

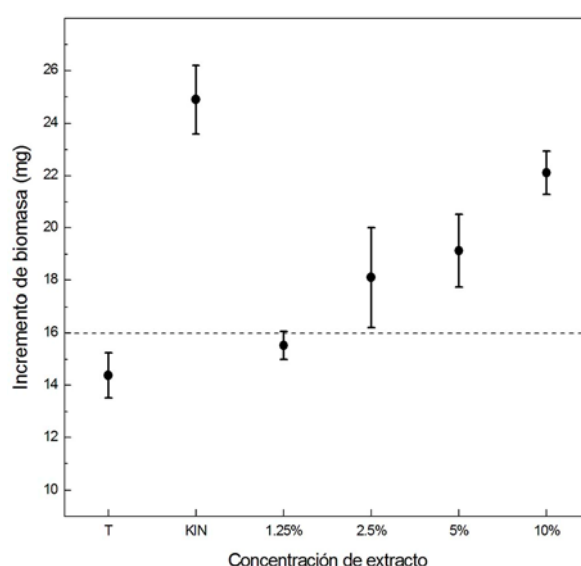


Figura 16. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de *L. trabeculata*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 15. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de *L. trabeculata*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	559.323	4	139.831	6.408	0.000
Intra-grupos	1527.484	70	21.821		
Total	2086.807	74			

Tabla 16. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa, en cotiledones tratados con extractos de *L. trabeculata*.

Concentración	alfa = 0.05	
	1	2
T	14.4	
5%		19.1
10%		22.1
Sig.	1.00	0.15

d) Extracto de *Chondracanthus chamissoi*

Los resultados del incremento de biomasa en los cotiledones tratados con extractos de *C. chamissoi* muestran diferencias significativas (fig. 9; tabla 17). La concentración 10% estimuló el incremento de biomasa (17.3 ± 0.9 mg), respecto del control negativo (14.4 ± 0.8 mg. Fig. 17). Sin embargo, las concentraciones más diluidas: 1.25, 2.5 y 5% estimularon un efecto de inhibición en el peso fresco de los cotiledones: 10.2 ± 0.6 mg, 11.3 ± 0.6 mg, 12.5 ± 0.7 mg, respectivamente. El análisis de comparación múltiple determina que cada una de las diluciones al 1.25%, 10% y el control negativo forman grupos homogéneos distintos (tabla 18).

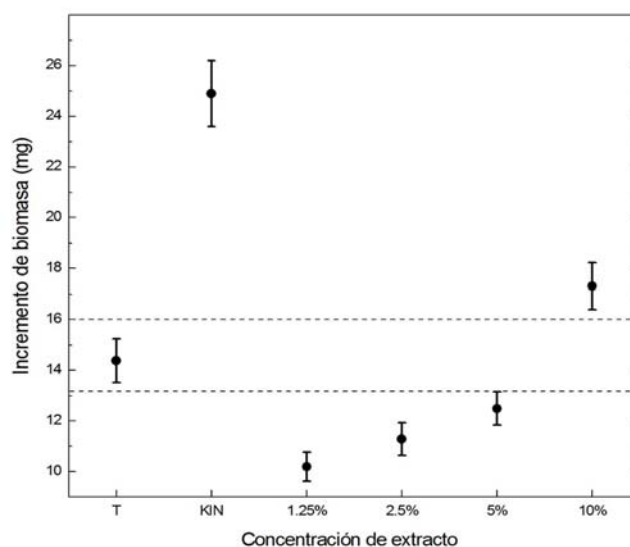


Figura 17. Bioactividad tipo citoquinina–incremento de biomasa. Gráfico de medias del incremento del peso fresco en cotiledones tratados con extractos acuosos de *C. chamissoi*. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 17. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable incremento de biomasa en cotiledones tratados con extracto de *C. chamissoi*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	471.018	4	117.754	14.203	0.000
Intra-grupos	580.352	70	8.291		
Total	1051.370	74			

Tabla 18. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable incremento de biomasa, en cotiledones tratados con extractos de *C. chamissoi*.

Concentración	alfa = 0.05		
	1	2	3
1.25%	10.193		
T		14.380	
10%			17.307
Sig.	1.000	1.000	1.000

5.3.3. Bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila

Los extractos acuosos de macroalgas no estimularon el de-etiolado de los cotiledones; sin embargo, el análisis de varianza determina que hay diferencias significativas respecto a los valores de absorbancia, entre los tratamientos con extractos de macroalgas y el control negativo (tabla 19). En los tratamientos con *M. pyrifera* la concentración al 5% registró el mayor valor de la absorbancia: 0.028 ± 0.003 ; mientras que al 10% hubo una ligera disminución. Las concentraciones 2.5, 5 y 10% del alga *L. trabeculata* tuvieron valores menores de absorbancia que la especie anterior: 0.019 ± 0.002 , 0.021 ± 0.001 y 0.020 ± 0.002 , respectivamente.

Los extractos de *U. nematoidea* registraron bajos niveles de absorbancia, siendo la absorbancia de la concentración 1.25%: 0.014 ± 0.001 , similar al control negativo: 0.014 ± 0.002 ; y al 5% hubo una inhibición: 0.005 ± 0.001 (fig. 18). En el análisis de comparación múltiple posterior al ANOVA, los extractos acuosos de *M. pyrifera* (5%),

L. trabeculata (5%), *U. nematoidea* (5%) y el control negativo forman grupos homogéneos distintos (tabla 20).

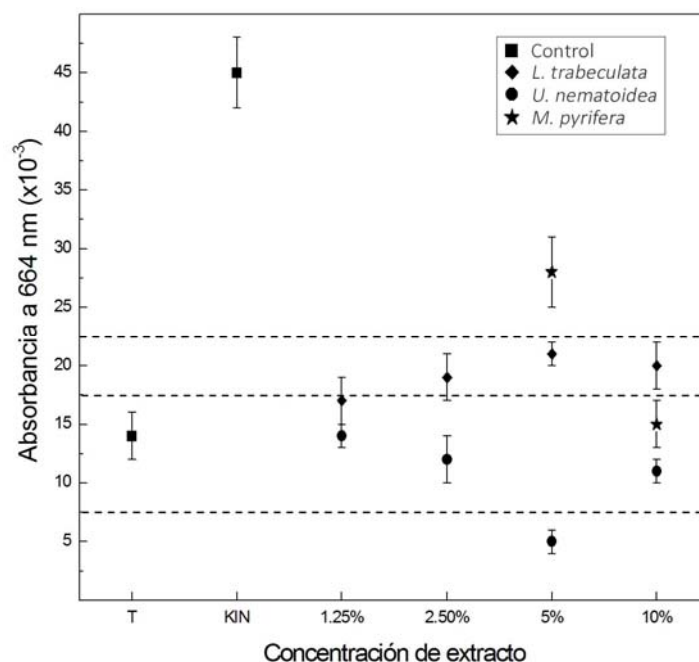


Figura 18. Bioactividad tipo citoquinina–síntesis de clorofila. Gráfico de medias del valor de la absorbancia a 664 nm. Las líneas punteadas separan las concentraciones que forman grupos homogéneos.

Tabla 19. ANOVA ($\alpha=0.05$) para la variable síntesis de clorofila.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0.002	10	0.000	13.007	0.000
Intra-grupos	0.001	52	0.000		
Total	0.003	62			

Tabla 20. Prueba Scheffé al 0.05, grupos homogéneos para la variable síntesis de clorofila.

Concentración	Subconjunto para alfa = 0.05			
	1	2	3	4
<i>U. nematoidea</i> (5 %)	0.005			
T		0.014		
<i>L. trabeculta</i> (5 %)			0.021	
<i>M. pyrifera</i> (5 %)				0.028
Sig.	1.000	1.000	1.000	1.000

6. DISCUSIÓN

La necesidad de presentar un bioensayo útil y confiable para demostrar la bioactividad de extractos de macroalgas sobre cotiledones etiolados, hizo necesario el ensayar diferentes tipos de sustrato para germinación (Dash y Panda 2001; Hampson y Simpson 1990; Prado *et al.* 2000; Zhao *et al.* 1992), tiempo de desarrollo de la plántula (Fletcher y McCullagh 1971; Zhao *et al.* 1992) y tiempo de tratamiento con fitohormonas y extractos de macroalgas (Stirk y Van Staden 1997; Zhao *et al.* 1992), determinándose que el mejor sustrato para germinación es una fuente de plástico con tres hojas de papel toalla, 200 ml de agua y regado interdiariamente con 100 ml, logrando una tasa de germinación de hasta el 85%. En cuanto al tiempo del desarrollo de los cotiledones, las plántulas de 6 días de edad son susceptibles a mostrar muy buenas respuestas a los extractos de macroalgas; y respecto del tiempo de tratamiento, 8 días fue el tiempo indicado para obtener diferencias estadísticamente significativas.

Zhao *et al.* (1992) y Fletcher y McCullagh (1971) trabajaron con cotiledones de *Cucumis sativus* de 3 y 6 días de edad respectivamente, sin tomar en cuenta la biomasa. En el presente estudio, se encontró una dispersión bastante significativa respecto de la biomasa de los cotiledones, por lo cual fue necesario hacer una calibración y ajuste para universalizar la muestra sometida a tratamiento, obteniendo un rango de 16 a 21,9 mg, que es el promedio más una desviación estándar (equivalente al 66% de la población).

Mediante el método mejorado del disco de papel de Zhao *et al.* (1992), se aseguró una mejor distribución y suspensión de las sustancias bioactivas de los extractos en el disco de papel filtro (evitando que precipiten sobre el fondo de la placa). El método de Fletcher y McCullagh (1971) para la prueba de síntesis de clorofila permitió realizar los bioensayos de forma sencilla, rápida y sensible comparada con otras técnicas, como en

cultivos de tejidos, que son complejas, costosas y tardan más tiempo en llevarse a cabo (Letham 1969).

Respecto de los resultados tipo fitohormonas, para la bioactividad tipo auxina-enraizamiento, la aplicación de los extractos de *U. nematoidea*, *M. pyrifera*, *L. trabeculata* y *C. chamissoi* tuvieron un efecto positivo y significativo en el desarrollo de raíces adventicias sobre los cotiledones de *Cucumis sativus*, siendo el extracto de la macroalga *M. pyrifera* la que mostró una mayor bioactividad, observándose no solo el mayor número de raíces, sino un número uniforme de raíces en los cuatro tratamientos (1.25, 2.5, 5 y 10%), a diferencia de *U. nematoidea* que mantuvo una tendencia al incremento en el número de raíces conforme aumentaba la concentración. *L. trabeculata* presentó un pico de bioactividad en la dilución 2.5%. Estos resultados, en los que se ha observado que los extractos han promovido el desarrollo de las raíces, concuerdan con los resultados obtenidos por Vélez *et al.* (2013), donde extractos orgánicos, ácidos y alcalinos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata* y *U. nematoidea* también promovieron el desarrollo de raíces en cotiledones de *Cucumis sativus*; asimismo, con el trabajo de Laura *et al.* (2012), en el cual hipocotilos de *Pisum sativum* se sumergieron en extractos alcalinos de *Desmarestia munda*, *M. pyrifera* y *L. trabeculata* y luego de 7 días también desarrollaron raíces adventicias en la superficie de corte y a los costados del tallo. Similar a este último resultado también fue observado por Kumari *et al.* (2011), donde el extracto acuoso del alga *Sargassum johnstonii* promovió el desarrollo de raíces adventicias en hipocotilos de *Vigna mungo*.

Respecto a la bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa, todos los tratamientos con los extractos de *U. nematoidea*, *M. pyrifera* y *L. trabeculata* tuvieron un resultado positivo y significativo en el incremento de la biomasa de los cotiledones, de los cuales *M. pyrifera* y *L. trabeculata* lograron los mejores resultados. En el caso de la

especie *C. chamissoi*, el extracto tuvo un efecto negativo en las concentraciones diluidas (1.25, 2.5 y 5%), inhibiendo el incremento de biomasa siendo menor, comparado con el control negativo, mientras que con el extracto al 10% se observó un incremento de la biomasa. Los incrementos de biomasa de los cotiledones concuerdan con los resultados obtenidos por Vélez *et al.* (2013) para extractos alcalinos de *M. pyrifera* y *L. trabeculata*. Otros trabajos llevados a cabo en cultivos de plantas muestran resultados similares respecto del incremento de biomasa, como el estudio de Sridhar y Rengasamy (2010) con extractos de *Ulva lactuca* aplicados a plántulas de *Tagetes erecta*, el trabajo de Rathore *et al.* (2009) con extracto de *Kappaphycus alvarezii* en plantas de *Glycine max*; y de Jeannin *et al.* (1991) con *Ascophyllum nodosum* sobre cultivos de *Zea mays*.

En la prueba de bioactividad tipo citoquinina-síntesis de clorofila, los extractos de *M. pyrifera* y *L. trabeculata* registraron un incremento en el valor de la absorbancia respecto del control negativo. A diferencia del tratamiento con *U. nematoidea*, donde el efecto fue inhibitorio en la concentración 5%. Este efecto inhibitorio también fue observado por Kumari *et al.* (2011) sobre cotiledones de *Cucumis sativus*, donde concentraciones altas del extracto *Sargassum johnstonii* (8 y 10%) provocaron una caída en el contenido total del pigmento por debajo de los niveles del control negativo.

La identificación de fitohormonas en los extractos de macroalgas (Featonby-Smith y Van Staden 1984; Li *et al.* 2007; Sanderson *et al.* 1987; Stirk *et al.* 2003, 2009; Tay *et al.* 1985, 1987; Tarakhovskaya *et al.* 2007; Zhang *et al.* 1991) ha llevado a pensar durante mucho tiempo que serían las responsables de todas las respuestas beneficiosas observadas en las plantas. Sin embargo, en un estudio reciente llevado a cabo por Wally *et al.* (2013) se determina que la cantidad de fitohormonas existentes en los extractos de macroalgas es insignificante y no ha logrado explicar la bioactividad sobre las plantas. Los efectos fisiológicos que se observan al aplicar extractos de algas se deberían a

componentes aún desconocidos en estructura y mecanismo de acción, que inducen o reprimen patrones de expresión genética, en primera, de biosíntesis de fitohormonas y además de metabolitos catabólicos de fitohormonas, siendo la respuesta observada fenotípicamente en el cotiledón una respuesta global a un conjunto de interacciones de fitohormonas o sus represores.

7. CONCLUSIONES

Los cotiledones de *Cucumis sativus* son sensibles a los extractos acuosos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata*, *U. nematoidea* y *C. chamissoi* en las concentraciones evaluadas (1.25, 2.5, 5 y 10%), y han permitido cuantificar bioactividad tipo auxina-enraizamiento, citoquinina-incremento de biomasa y citoquinina-síntesis de clorofila.

Los extractos acuosos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata*, *U. nematoidea* y *C. chamissoi* tienen bioactividad tipo auxina-enraizamiento, pues promueven el desarrollo de raíces adventicias sobre cotiledones de *Cucumis sativus*. El extracto acuoso de *M. pyrifera* tiene la mayor bioactividad tipo auxina-enraizamiento: 4.1 ± 0.4 raíces.

Los extractos acuosos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata* y *U. nematoidea* tienen bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa. El extracto acuoso de *M. pyrifera* tiene la mayor bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa: 22.7 ± 0.8 mg, mientras que el extracto de *C. chamissoi* inhibe el incremento de biomasa de los cotiledones de *Cucumis sativus*, en las concentraciones 1.25, 2.5, y 5%.

En base a la metodología ensayada, los extractos acuosos de *M. pyrifera*, *L. trabeculata*, *U. nematoidea* y *C. chamissoi* no promueven la síntesis de clorofila.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar bioensayos con extractos acuosos combinados. Podría combinarse el extracto de *M. pyrifera* (proliferación de raíces) y *C. chamissoi* (inhibición del crecimiento del cotiledón) para lograr, probablemente, una mayor proliferación de raíces, actividad deseable en los procesos de propagación por esquejes. Por otro lado, también se recomienda cuantificar la bioactividad de otras especies de macroalgas de nuestra costa peruana con el bioensayo propuesto en la tesis.

Se espera que los resultados obtenidos en esta investigación permitan que los empresarios peruanos den un mayor valor al recurso macroalga para la elaboración y oferta de fertilizantes naturales, necesarios en la agricultura orgánica, y que también pueden ser utilizados por la agricultura convencional.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acleto, C. 1988. "Aspectos Fitogeográficos y Taxonómicos de las Algas Marinas del Perú." *Gayana Botanica* 45 (1-4): 143–46.
- Aldworth, S. J., and J. Staden. 1987. "The Effect of Seaweed Concentrate on Seedling Transplants." *South African Journal of Botany* 53 (3): 187–89.
- Atzmon, N., and J. Staden. 1994. "The Effect of Seaweed Concentrate on the Growth of *Pinus pinea* Seedlings." *New Forests* 8 (3): 279–88. Doi:10.1007/bf00025373.
- Badgley, C., J. Moghtader, E. Quintero, E. Zakem, M. J. Chappell, and K. Avilés-Vázquez, et al. 2007. "Organic Agriculture and the Global Food Supply." *Renewable Agriculture and Food Systems* 22 (2): 86-108. Doi:10.1017/S1742170507001640.
- Bengtsson, J., J. Ahnström, and A-C. Weibull. 2005. "The Effects of Organic Agriculture on Biodiversity and Abundance: a Meta-analysis." *Journal of Applied Ecology* 42 (2): 261-69. Doi:10.1111/j.1365-2664.2005.01005.x.
- Blunden, G., and P. B. Wildgoose. 1977. "The Effects of Aqueous Seaweed Extract and Kinetin on Potato Yields." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 28 (2): 121–25. Doi:10.1002/jsfa.2740280203.
- Bhosle, N., A. Untawale, and V. Dhargalker. 1975. "Effect of Seaweed Extract on Growth of *Phaseolus vulgaris*." *Indian Journal Marine Science* 4: 208-10 (No visto, citado por Thambiraj et al. 2012).
- Craigie, J. 2011. "Seaweed Extract Stimuli in Plant Science and Agriculture." *Journal of Applied Phycology* 23 (3): 371-93. Doi:10.1007/s10811-010-9560-4.
- Crouch, I. J., and J. Van Staden. 1992. "Effect of Seaweed Concentrate on the Establishment and Yield of Greenhouse Tomato Plants." *Journal of Applied Phycology* 4 (4): 291-96. Doi:10.1007/BF02185785.
- Dash, M., and S. K. Panda. 2001. "Salt Stress Induced Changes in Growth and Enzyme Activities in Germinating *Phaseolus vulgaris* Seeds." *Biología Plantarum* 44 (4): 587-89. Doi:10.1023/A:1013750905746.
- Duan, D., X. Liu, F. Pan, H. Liu, N. Chen, and X. Fei. 1995. "Extraction and Identification of Cytokinin from *Laminaria japonica* Aresch." *Botanica Marina* 38 (1-6): 409. Doi:10.1515/botm.1995.38.1-6.409.
- Eswaran, K., P. K. Ghosh, A. K. Siddhanta, J. S. Patolia, C. Periyasamy, A. S. Mehta, et al., inventors. 2005. "Integrated Method for Production of Carrageenan and Liquid Fertilizer from Fresh Seaweeds." US patente 6893479. May 17.
- Featonby-Smith, B. C., and J. Van Staden. 1984. "Identification and Seasonal Variation of Endogenous Cytokinins in *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenf." *Botanica Marina* 27 (11): 527–31. Doi:10.1515/botm.1984.27.11.527.

- Featonby-Smith B. C., and J. Van Staden. 1983. "The Effect of Seaweed Concentrate on the Growth of Tomato Plants in Nematode-infested Soil." *Scientia Horticulturae* 20 (2): 137-46. Doi:10.1016/0304-4238(83)90134-6.
- Fletcher, R. A., and D. McCullagh. 1971. "Cytokinin-induced Chlorophyll Formation in Cucumber Cotyledons." *Planta* 101 (1): 88-90.
- Gireesh, R., C. K. Haridevi, and J. Salikutty. 2011. "Effect of *Ulva lactuca* Extract on the Growth and Proximate Composition of *Vigna unguiculata* L. Walp." *Journal of Reseach in Biology* 1 (8): 624-30.
- Guiry, M. D., and G. M. Guiry. 2014. "AlgaeBase." [Online]. Galway: National University of Ireland. Cited 10th february. Disponible en <http://www.algaebase.org>
- Hampson, C. R., and G. M. Simpson. 1990. "Effects of Temperature, Salt, and Osmotic Potential on Early Growth of Wheat (*Triticum aestivum*). I. Germination." *Canadian Journal of Botany* 68: 524-28.
- Harvey, B. M. R., B. C. Lu, and R. A. Fletcher. 1974. "Benzyladenine Accelerates Chloroplast Differentiation and Stimulates Photosynthetic Enzyme Activity in Cucumber Cotyledons." *Canadian Journal of Botany* 52 (12): 2581-86. Doi:10.1139/b74-334.
- Hong, D. D., H. M. Hien, and P. N. Son. 2007. "Seaweeds from Vietnam Used for Functional Food, Medicine and Biofertilizer." *Journal of Applied Phycology* 19 (6): 817-26. Doi:10.1007/s10811-007-9228-x.
- Jeannin, I., J. C. Lescure, and J. F. Morot-Gaudry. 1991. "The Effects of Aqueous Seaweed Sprays on the Growth of Maize." *Botanica Marina* 34 (6): 469-73. Doi:10.1515/botm.1991.34.6.469.
- Kalaivanan, C., and V. Venkatesalu. 2012. "Utilization of Seaweed *Sargassum myriocystum* Extracts as a Stimulant of Seedlings of *Vigna mungo* (L.) Hepper." *Spanish Journal of Agricultural Research* 10 (2): 466-70. Doi:10.5424/sjar/2012102-507-10.
- Khan, W., U. Rayirath, S. Subramanian, M. Jithesh, P. Rayorath, D. M. Hodges, et al. 2009. "Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development." *Journal of Plant Growth Regulation* 28 (4): 386-99. Doi:10.1007/s00344-009-9103-x.
- Kumar, N. A., B. Vanlalzarzova, S. Sridhar, and M. Baluswami. 2012. "Effect of Liquid Seaweed Fertilizer of *Sargassum wightii* Grev. on the Growth and Biochemical Content of Green Gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek)." *Recent Research in Science and Technology* 4 (4): 40-45.
- Kumari, R., I. Kaur, and A. K. Bhatnagar. 2011. "Effect of Aqueous Extract of *Sargassum johnstonii* Setchell & Gardner on Growth, Yield and Quality of *Lycopersicon esculentum* Mill." *Journal of Applied Phycology* 23 (3): 623-33. Doi:10.1007/s10811-011-9651-x.

- Laura, Y., S. Santome, M. Torres, P. Tacuri, and C. Córdova. 2012. "Enraizamiento en Explantos de Plántulas de *Pisum sativum*." *XXI Reunión Científica ICBAR*. Lima-Perú. 137p.
- Letham, D. S. 1967. "Chemistry and physiology of kinetin- like compounds." *Annual Review Plant Physiology* 18: 349-64.
- Li, T., C. Wang, and J. Miao. 2007. "Identification and Quantification of Indole-3-acetic Acid in the Kelp *Laminaria japonica* Areschoug and its Effect on Growth of Marine Microalgae." *Journal of Applied Phycology* 19 (5): 479-84. Doi:10.1007/s10811-007-9159-6.
- Lotter, D. W. 2003. "Organic Agriculture." *Journal of Sustainable Agriculture* 21 (4): 59-128.
- Mancuso, S., E. Azzarello, S. Mugnai, and X. Briand. 2006. "Marine Bioactive Substances (IPA extract) Improve Foliar Ion Uptake and Water Stress Tolerance in Potted *Vitis vinifera* Plants." *Adv. Hort. Sci.* 20 (2): 156-61.
- Nabti, E., M. Sahnoune, M. Ghoul, D. Fischer, A. Hofmann, M. Rothballer, et al. 2010. "Restoration of Growth of Durum Wheat (*Triticum durum* var. waha) Under Saline Conditions Due to Inoculation with the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* NH and Extracts of the Marine Alga *Ulva lactuca*." *Journal of Plant Growth Regulation* 29 (1): 6-22. Doi:10.1007/s00344-009-9107-6.
- Prado, F., C. Boero, M. Gallardo, and J. González. 2000. "Effect of NaCl on Germination, Growth, and Soluble Sugar Content in *Chenopodium quinoa* Willd. Seeds." *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: 27-34.
- Rama-Rao, K. 1990. "Preparation of liquid seaweed fertilizer from *Sargassum*." In: *Seaweed Research and Utilisation Association Workshop on Algal products and Seminar on Phaeophyceae in India Marine Algal Research Station*. 16p.
- Rathore, S. S., D. R. Chaudhary, G. N. Boricha, A. Ghosh, B. P. Bhatt, S. T. Zodape, et al. 2009. "Effect of Seaweed Extract on the Growth, Yield and Nutrient Uptake of Soybean (*Glycine max*) under Rainfed Conditions." *South African Journal of Botany* 75 (2): 351–55. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2008.10.009.
- Rayorath, P., M. Jithesh, A. Farid, W. Khan, R. Palanisamy, S. Hankins, et al. 2008. "Rapid Bioassays to Evaluate the Plant Growth Promoting Activity of *Ascomyces nodosum* (L.) Le Jol. Using a Model Plant, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh." *Journal of Applied Phycology* 20(4): 423-29. Doi:10.1007/s10811-007-9280-6.
- Sanderson, K. J., P. E. Jameson, and J. A. Zabkiewicz. 1987. "Auxin in a Seaweed Extract: Identification and Quantitation of Indole-3-Acetic Acid by Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Journal of Plant Physiology* 129 (3–4): 363–67. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(87)80093-7.
- Sasikumar, K., T. Govindan, and C. Anuradha. 2011. "Effect of Liquid Fertilizer of *Dictyota dichotoma* on Growth and Yield of *Abelmoschus esculentus* L." *European Journal of Experimental Biology* 1(3): 223-7.

- SENASA. 2012. "Producción Orgánica." [Online]. Ministerio de Agricultura. Lima-Perú. Disponible en http://www.senasa.gob.pe/0/modulos/JER/JER_Interna.aspx?ARE=0&PFL=3&JER=134
- Sridhar, S., and R. Rengasamy. 2010. "Effect of Seaweed Liquid Fertilizer on the Growth, Biochemical Constituents and Yield of *Tagetes erecta*, Under Field Trial." *Journal of Phytology* 6(2): 61-8.
- Stirk, W. A., O. Novák, V. Hradecká, A. Pěnčík, J. Rolčík, M. Strnad, et al. 2009. "Endogenous Cytokinins, Auxins and Abscissic Acid in *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Dictyota humifusa* (Phaeophyta): Towards Understanding Their Biosynthesis and Homeostasis." *European Journal of Phycology* 44 (2): 231-40. Doi:10.1080/09670260802573717.
- Stirk, W. A., O. Novák, M. Strnad, and J. Van Staden. 2003. "Cytokinins in Macroalgae." *Plant Growth Regulation* 41 (1): 13-24. Doi:10.1023/A:1027376507197.
- Stirk, W., and J. Van Staden. 1997. "Comparison of Cytokinin- and Auxin-like Activity in Some Commercially Used Seaweed Extracts." *Journal of Applied Phycology* 8 (6): 503-8. Doi:10.1007/bf02186328.
- Tanaka, A., and H. Tsuji. 1980. "Effects of Calcium on Chlorophyll Synthesis and Stability in the Early Phase of Greening in Cucumber Cotyledons." *Plant Physiology* 65 (6): 1211-15. Doi:10.1104/pp.65.6.1211.
- Tay, S. A. B., L. M. S. Palni, and J. K. MacLeod. 1987. "Identification of Cytokinin Glucosides in a Seaweed Extract." *Journal of Plant Growth Regulation* 5 (3): 133-38. Doi:10.1007/BF02087181.
- Tay, S. A. B., J. K. Macleod, L. M. S. Palni, and D. S. Letham. 1985. "Detection of Cytokinins in a Seaweed Extract." *Phytochemistry* 24 (11): 2611-14. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80679-2.
- Tarakhovskaya, E. R., Y. Maslov, and M. F. Shishova. 2007. "Phytohormones in Algae." *Russian Journal of Plant Physiology* 54(2): 163-70. Doi:10.1134/S1021443707020021.
- Thambiraj, J., K. Lingakumar, and S. Paulsamy. 2012. "Effect of Seaweed Liquid Fertilizer (SLF) Prepared from *Sargassum wightii* and *Hypnea musciformis* on the Growth and Biochemical Constituents of the Pulse, *Cyamopsis tetragonoloba* (L)." *Journal of Research in Agriculture* 1 (1): 65-70.
- Thirumaran, G., M. Arumugan, R. Arumugan, P. Anantharaman. 2009. "Effect of Seaweed Liquid Fertilizer on Growth and Pigment Concentration of *Abelmoschus esculentus* (l) medikus." *American-Eurasian Journal of Agronomy* 2(2): 57-066.
- Van Staden, J., S. J. Upfold, and F. E. Drewes. 1994. "Effect of Seaweed Concentrate on Growth and Development of the Marigold *Tagetes patula*." *Journal of Applied Phycology* 6(4): 427-28.
- Velez, J., S. Santome, N. Pérez, and C. Córdova. 2013. "Bioensayos de Actividad Tipo Fitohormonas con Extractos de Macroalgas Promisorias de la Costa Peruana."

IV Congresso Latino-Americano de Biotecnologia de Algas e IV Workshop da Redealgas. Florianópolis-Brasil.

- Wally, O. D., A. Critchley, D. Hiltz, J. Craigie, X. Han, L. I. Zaharia, et al. 2013. "Regulation of Phytohormone Biosynthesis and Accumulation in *Arabidopsis* Following Treatment with Commercial Extract from the Marine Macroalga *Ascophyllum nodosum*." *Journal of Plant Growth Regulation* 32(2): 324-39. Doi:10.1007/s00344-012-9301-9.
- Willer, H., and L. Klicher. 2009. "The World of Organic Agriculture, Statistics and Emerging Trends." *IFOAM, Bonn, FiBL, Frick. ITC*. Geneva.
- Zhang, W., D. J. Chapman, B. O. Phinney, C. R. Spray, H. Yamane, and N. Takahashi. 1991. "Identification of Cytokinins in *Sargassum muticum* (Phaeophyta) and *Porphyra perforata* (Rhodophyta)." *Journal of Phycology* 27 (1): 87–91. Doi:10.1111/j.0022-3646.1991.00087.x.
- Zhao, Z. R., Z. L. Wu, G. Q. Huang, and G. R. Li. 1992. "An Improved Disk Bioassay for Determining Activities of Plant Growth Regulators." *Journal of Plant Growth Regulation* 11 (4): 209–13. Doi:10.1007/BF02115479.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1: Marcas comerciales de extracto de macroalgas en el mundo

Marca Comercial	Especie
"Goemar GA 14"	<i>Ascophyllum nodosum</i>
"Maxicrop"	<i>Ascophyllum nodosum</i>
"Kelpak"	<i>Ecklonia máxima</i>
"SEASOL"	<i>Durvillea potatorum</i>
"IPA"	Laminariaceae
"SM3"	Laminariaceae y Fucaceae

10.2. Anexo 2: Características de los materiales y equipos utilizados

➤ Material biológico:

Semillas de *Cucumis sativus*: variedad “Marketmore 76”, pureza 99.9%, 85 % de germinación, comercializado por “Toyama Seed”, lote 161057D0011 y fecha de envasado 02/12.

➤ Hormonas estándar:

IAA: Ácido Indol Acético: (I2886-5G Sigma-Aldrich, CAS 525-79-1, Lote 072M4080V).

Kinetina: (K3378-1G Sigma-Aldrich, CAS 87-51-4, Lote 061M1429V).

➤ Equipos:

Estufa: “Oven/Incubator, Dual-Purpose” modelo ATOI-050-A, con flujo de aire caliente, de temperatura y tiempo programable.

Incubadora: “Incucell” de temperatura y tiempo programable.

Molino: “Moulinex”, molino eléctrico.

Centrífuga: “Gemmyco”, modelo PLC-01.

Espectrofotómetro: “Unico”, modelo 2102.

Balanza: “OHAUS”, balanza analítica.

Micropipeta: “Axypet”, de rango 100-1000 µl.

➤ Materiales:

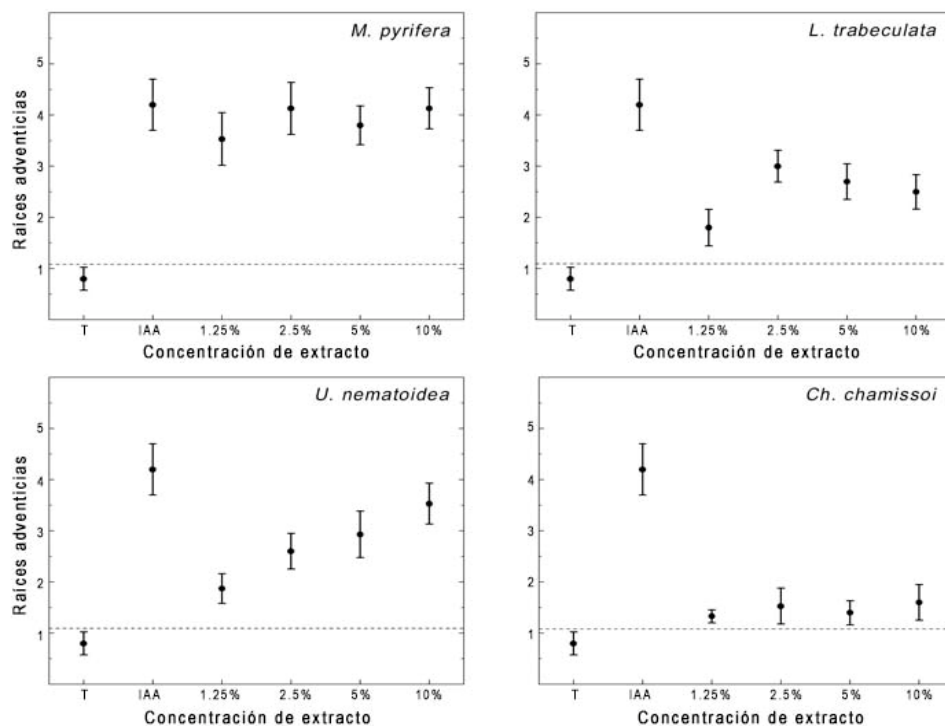
Disco de papel filtro: “Munktell-Alemania”, grado 389, diámetro 90 mm, código 3.102.090, Lote n° 11-066).

Agar: “Agar chino”, un paquete de 40 g, adquirido en el barrio chino del centro de Lima.

Materiales de vidrio: Pipetas, beakers, placas petri, probetas, erlenmeyer.

10.3. ANEXO 3. Gráficos comparativos de la bioactividad de extractos acuosos de macroalgas.

a) Bioactividad tipo auxina-enraizamiento:



b) Bioactividad tipo citoquinina-incremento de biomasa.

